

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISION DE INGENIERÍA

**DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN
EN POLÍMEROS Y MATERIALES**

**Nanopartículas de quitosano hidrofobizado con
potencial terapéutico en el suministro de insulina**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

Por:

Emmanuel Robles Avila

Hermosillo, Sonora

Abril de 2013



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN DE TESIS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de doctorado de Emmanuel Robles Avila, han determinado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias
(Presidente)

Dra. M. Guadalupe Burboa Zazueta
(Secretario)

Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín
(Vocal)

Dr. Enrique F. Velázquez Contreras
(Vocal)

Dr. Rubén Darío Cadenas Nava
(Vocal Externo)

Dr. Luis Enrique. Gutiérrez Millán
(Vocal Suplente)

Miembros del Jurado de Tesis:

Presidente	Dr. Miguel A. Valdés Covarrubias
Secretario	Dra. M. Guadalupe Burboa Zazueta
Vocal	Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín
Vocal	Dr. Enrique F. Velázquez Contreras
Vocal Externo	Dr. Rubén Darío Cadenas Nava
Suplente	Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán

Dr. Miguel Ángel Valdés Covarrubias
Director de Tesis

Dra. M. Guadalupe Burboa Zazueta
Co-Director de Tesis

Para Ema...

MI PRIMER AMOR

Eres mi primer amor
eres quien le ha dado vida a mi corazón
con una sonrisa, una tierna caricia, me tocas el alma
se me acaba el miedo con ver mi reflejo en tu dulce mirada.

Eres mi primer amor
que me perdona todo sin guardarme rencor
con brazos abiertos me brindas aliento si ando a la deriva
sin poner condiciones me entregas tu amor, sin pedir exclusivas.

Y aun que sabes que comparto mi amor
de alegría se te llena los ojos al ver que alguien me hace feliz
y aunque sabes que comparto mi amor
me esperas aún cuando parece que a veces me olvido de ti.

Mi primer amor
qué bendición tenerte aún en mi vida
si no estuvieras yo no sé qué haría
seguro no habría quién me entendiera como tú.

Mi primer amor
aunque comparto con alguien mis sueños
no dudes nunca cuánto te quiero
y que te llevo dentro, muy dentro de mi corazón
mi primer amor, un amor así no se puede callar
que sepa el mundo entero cuánto te amo y te quiero...Mamá.

Mamá, gracias por darme la vida
y de hacer de mí lo que soy
no tengo con qué pagarte
el lugar que me guardas en tu corazón
quiero que sepas
que aunque en la vida existan tantos amores
tú siempre serás mi primer amor.

Autor: Beto Zapata

Agradecimientos

Quiero agradecer al Dr. Miguel A. Valdés por aceptar dirigir mi investigación de doctorado y apoyarme en los momentos difíciles. Por brindarme su confianza y tener para mí siempre un consejo que me permitiera avanzar tanto en lo académico como en lo personal. Agradezco de corazón su tolerancia, comprensión y ayuda para poder lograr mi meta.

A la Dra. María G. Burboa por permitirme realizar mi estancia de investigación en el laboratorio de Biomateriales del DICTUS y brindarme material, reactivos y los instrumentos de medición para realizar los estudios de asociación y liberación de la insulina. Así, como su amistad y apoyo en todo momento. También quiero extender mi agradecimiento a los Doctores Víctor Mosquera, Pablo Taboada, Josué Juárez, Manuel Alatorre y Eva Villar del laboratorio de Física de Coloides y Polímeros del Departamento de Física de la Materia Condensada de la Universidad de Santiago de Compostela en España por brindarme su ayuda en las mediciones de ITC, TEM y PZ, así como su colaboración en la interpretación de resultados y redacción del manuscrito publicado.

A mis compañeros y amigos que he hecho a lo largo de mi estancia académica en el Departamento de Física, así como a los profesores e investigadores que me formaron y ayudaron a mi crecimiento científico y humano. A mi hermosa familia quienes siempre me brindan su cariño y me alientan a superarme cada día creyendo y preocupándose por mí. También a mi novia Sonia por acompañarme en esta larga pero satisfactoria prueba de vida, brindándome su amor, cariño y apoyo.

Por último deseo agradecer al CONACyT por el apoyo económico brindado con la beca de doctorado y por los apoyos recibidos por parte de los proyectos de investigación con número de registro 90345 y 151794. Así mismo, extendiendo mi agradecimiento al Departamento de Investigación de Polímeros y Materiales, y a la misma Universidad de Sonora por albergarme durante mis estudios, siempre en un ambiente de solidaridad y compañerismo por parte de toda su infraestructura humana.

Gracias a todos y cada uno de Ustedes...

Tabla de Contenido

<i>Lista de Símbolos</i>	xv
<i>Lista de Figuras</i>	xvii
<i>Lista de Tablas</i>	xxii
<i>Resumen</i>	xxiii
<i>Abstract</i>	xxv
<i>Objetivos</i>	xxvii
<i>General</i>	<i>xxvii</i>
<i>Particulares</i>	<i>xxvii</i>
Capítulo I	1
1 Introducción	2
Capítulo II	6
2 Antecedentes	7
2.1 <i>Qitosano</i>	<i>10</i>
2.2 <i>Insulina</i>	<i>12</i>
Capítulo III	14
3 Experimental	15
3.1 <i>Materiales</i>	<i>16</i>

3.2	<i>Derivatización del Quitosano</i>	17
3.3	<i>Síntesis de Nanopartículas</i>	19
3.4	<i>Instrumentos de Medición</i>	20
3.4.1	Resonancia Magnética Nuclear.....	20
3.4.2	Espectroscopía de Infrarrojo.....	20
3.4.3	Tensiometría de Gota.....	22
3.4.4	Dispersión Dinámica de Luz.....	23
3.4.5	Potencial Zeta.....	23
3.4.6	Microscopía de Fuerza Atómica.....	25
3.4.7	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	25
3.4.8	Calorímetro de Titulación Isotérmica.....	27
3.4.9	Dicroísmo Circular.....	29
3.5	<i>Análisis cuantitativo de la insulina en las NPs</i>	29
3.6	<i>Estudios de liberación in vitro</i>	31
	Capítulo IV	32
4	Resultados y Discusiones	33
4.1	<i>Quitosanos derivatizados</i>	33
4.1.1	Evidencia de la derivatización del Quitosano.....	35
4.1.1.1	RMN ¹ H de los Quitosanos derivatizados.....	35
4.1.1.2	FT-IR de los Quitosanos derivatizados.....	36
4.1.1.3	Tensiometría de gota.....	40
4.2	<i>Formación de Nanopartículas de quitosano-insulina</i>	45
4.2.1	Evidencia de asociación de las NPQIs.....	45

4.2.1.1	FT-IR de las NPQIs	45
4.3	<i>Caracterización física de las nanopartículas.</i>	52
4.3.1	Dispersión Dinámica de Luz (DLS).	52
4.3.2	Potencial Zeta (PZ).....	54
4.3.3	Imágenes de TEM y AFM de las NPs insulina-quitosano.	56
4.4	<i>Estudio Termodinámico.</i>	62
4.4.1	Energía de formación de las NPs Quitosano-Insulina.....	62
4.4.2	Magnitudes termodinámicas del proceso de formación las NPQIs.	68
4.5	<i>Eficiencia de asociación y de carga de las NPQIs.</i>	70
4.5.1	Eficiencia de asociación y capacidad de carga.	70
4.5.2	Proceso de liberación de la insulina de la nanopartícula.	72
4.6	<i>Conformación estructural de la insulina.</i>	78
Capítulo V	80
5	Conclusiones	81
	<i>Perspectivas y Recomendaciones</i>	83
	<i>Referencias</i>	84
	<i>Anexos</i>	91
	<i>Anexo 1</i>	91
	Método Alternativo de formación de las NPs.....	91
	<i>Anexo 2</i>	93
	Trabajos Presentados.....	93

Anexo 3..... 95

Publicación 95

Lista de Símbolos

ATP	Adenosín trifosfato	δ	Desplazamiento químico
Q^*	Calor molar	AE	Eficiencia de asociación
ΔG	Cambio en la energía libre de Gibbs	LE	Eficiencia de carga
ΔH	Cambio entálpico	θ	Elipticidad
ΔS	Cambio entrópico	n	Estequiometría
X	Concentración de ligandos	Θ	Fracción de sitios ocupados
$[X]$	Concentración de ligandos no asociados	$F.C.R.$	Fuerza centrífuga relativa
M	Concentración molar	pK_a	Fuerza de disociación
K_b	Constante de asociación	G	Fuerza de gravedad
K_B	Constante de Boltzmann	g	Gravedad

®	Marca registrada	Qm8c	Quitosano modificado (octilaldehído) al 50 % de sustitución
E'	Módulo elástico	Qm10b	Quitosano modificado (decilaldehído) al 10 % de sustitución
E''	Módulo viscoso	Qm12a	Quitosano modificado (dodecilaldehído) al 5 % de sustitución
NP	Nanopartícula	Qm12b	Quitosano modificado (dodecilaldehído) al 10 % de sustitución.
NPQ	NP de quitosano	Qm12c	Quitosano modificado (dodecilaldehído) al 50 % de sustitución.
NPQI	NP de insulina-quitosano	R_H	Radio hidrodinámico
pH	Potencial de Hidrógeno	T	Temperatura
pI	Punto isoeléctrico	TPP	Tripolifosfato Pentasódico
Qm	Quitosano comercial	U.I.	Unidades Internacionales
Qm8a	Quitosano modificado (octilaldehído) al 5 % de sustitución	η	Volumen
Qm8b	Quitosano modificado (octilaldehído) al 10 % de sustitución	V	viscosidad

Lista de Figuras

Figura 1.- Quitina.	10
Figura 2.- Quitosano.	12
Figura 3.- Insulina Humana (estructura primaria).	13
Figura 4.- Reacción de derivatización del quitosano.	17
Figura 5.- Etapas de la reacción para la obtención del quitosano derivatizado.	18
Figura 6.- Imágenes ilustrativas del proceso formación las NPs por gelificación ionotrópica.	20
Figura 7.- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear de la marca Bruker (modelo Avance 400).	21
Figura 8.- Espectrómetro de infrarrojo de la marca Perkin-Elmer (modelo Spectrum GX).	21
Figura 9.- Tensiómetro de gota de la marca I.T. Concept (modelo Tracker).	24
Figura 10.- Dispensador de luz de la marca ALV-GmbH (modelo ALV-5000/E).	24
Figura 11.- Zetámetro de la marca Malvern Instrumens (modelo Nano ZS).	25
Figura 12.- Microscopio de fuerza atómica marca JEOL (modelo JSPM-4210).	26
Figura 13.- Microscopio electrónico de transmisión marca Phillips (modelo CM-12).	26
Figura 14.- Microcalorímetro de titulación isotérmica de la marca MicroCal (modelo VP-ITC).	28

Figura 15.- Espectropolarímetro de la marca Jasco (modelo J-810).....	29
Figura 16.- Espectrofotómetro UV-Vis de la marca Beckman Coulter (modelo AD-340).	31
Figura 17.- Espectros de RMN ^1H del quitosano comercial (Qm) y de los quitosanos derivatizados con octilaldehído, en porcentaje de sustitución del 5, 10 y 50 % (Qm8a, Qm8b, Qm8c, respectivamente) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$	37
Figura 18.- Espectros de RMN ^1H del Qm y del quitosano derivatizado con decilaldehído, con un porcentaje de sustitución del 10 % (Qm10b) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$	38
Figura 19.- Espectros de RMN ^1H del Qm y de los quitosanos derivatizados con dodecilaldehído, en porcentaje de sustitución del 5, 10 y 50 % (Qm12a, Qm12b, Qm12c, respectivamente) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$	39
Figura 20.- Espectros de FT-IR del Qm y de los quitosanos derivatizados Qm8a, Qm8b, y Qm8c.	41
Figura 21.- Espectros de FT-IR del Qm y del quitosano derivatizado Qm10b.....	42
Figura 22.- Espectros de FT-IR del Qm y de los quitosanos derivatizados Qm12a, Qm12b, y Qm12c.	43
Figura 23.- Módulos elásticos (E') y viscosidad (E''/ω) vs. frecuencia en la interfase aire-líquido de suspensiones poliméricas en solución acuosa de quitosano comercial Qm, y quitosanos derivatizados con aldehído de 12 carbonos en proporciones de sustitución de 5, 10 y 50 %. Estas mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Las líneas representan el ajuste teórico del modelo de Maxwell simple.....	46

Figura 24.- Espectro de FT-IR del Qm y de nanopartículas hechas con Qm con y sin insulina (NPQI y NPQ, respectivamente).	48
Figura 25.- Espectro de FT-IR del quitosano derivatizado Qm8b y de nanopartículas hechas con Qm8b con y sin insulina (NPQI y NPQ, respectivamente).	49
Figura 26.- Espectro de FT-IR del quitosano derivatizado Qm10b, y de nanopartículas hechas con Qm10b con y sin insulina (NPQI y NPQ, respectivamente).	50
Figura 27.- Espectro de FT-IR del quitosano derivatizado Qm12b, y de nanopartículas hechas con Qm12b con y sin insulina (NPQI y NPQ, respectivamente).	51
Figura 28.- Imagen obtenida por TEM de las NPQIs realizadas con quitosano derivatizado con octilaldehído con grado de sustitución del 5 % (Qm8a).....	58
Figura 29.- Imagen obtenida por TEM de las NPQIs realizadas con quitosano derivatizado con dodecilaldehído al 10 % sustitución (Qm12b).	59
Figura 30.- Imágenes de AFM: (a) NPQs elaboradas con quitosano sin modificar (Qm), (b) perfil de alturas de las NPs mostradas en la imagen.....	60
Figura 31.- Imágenes de AFM: (a) NPQs elaboradas con el quitosano derivatizado Qm8b, (b) NPQs elaboradas con el quitosano derivatizado Qm12b, (c) corresponde a las NPQIs realizadas con Qm12b.	61
Figura 32.- Calor de formación de NPs de quitosano-insulina, en función de la relación molar insulina/quitosano. Las NPs fueron formadas con el Qm y los diferentes quitosanos derivatizados con octilaldehído en las diferentes proporciones. La línea sólida representa el	

ajuste matemático de los datos experimentales. Las contribuciones de las diluciones fueron sustraídas. Temperatura de la celda de medición fue de 25 °C..... 65

Figura 33.- Calor de formación de NPs de quitosano-insulina, en función de la relación molar insulina/quitosano. Las NPs fueron formadas con el Qm y quitosano derivatizado con decilaldehído con grado de sustitución del 10 %. La línea sólida representa el ajuste matemático de los datos experimentales. Las contribuciones de las diluciones fueron sustraídas. Temperatura de la celda de medición fue de 25 °C..... 66

Figura 34.- Calor de formación de NPs de quitosano-insulina, en función de la relación molar insulina/quitosano. Las NPs fueron formadas con el Qm y los diferentes quitosanos derivatizados con dodecilaldehído en las diferentes proporciones. La línea sólida representa el ajuste matemático de los datos experimentales. Las contribuciones de las diluciones fueron sustraídas. Temperatura de la celda de medición fue de 25 °C..... 67

Figura 35.- Cinética de liberación *in vitro* de la insulina de NPs formadas con Qm y quitosano derivatizados dispersas en un buffer de acetato a un pH 5.3 y a una temperatura de 37 °C. 75

Figura 36.- Cinética de liberación *in vitro* de la insulina de NPs formadas con Qm y quitosano derivatizados dispersas en buffer de fosfato a un pH 6.0 y a una temperatura de 37 °C. 76

Figura 37.- Cinética de liberación *in vitro* de la insulina de NPs formadas con Qm y quitosano derivatizados dispersas en buffer de fosfatos a un pH 7.4 y a una temperatura de 37 °C..... 77

Figura 38.- Espectro de dicroísmo circular en la región lejana y cercana de UV de la insulina sin acomplejar e insulina liberada tras la acomplejación con diferentes quitosanos después de 6 horas en buffer fosfato (pH 7.4).79

Lista de Tablas

Tabla 1.- Variedad de quitosanos derivatizados.....	34
Tabla 2.- Ajuste de Maxwell del módulo elásticos, viscoso y de los tiempos de relajación de la interfase aire-líquido de las suspensiones de polímero en solución acuosa del Qm y de los quitosanos derivatizados con dodecilaldehído, con porcentaje de sustitución del 5, 10 y 50 %.	44
Tabla 3.- Diámetro promedio medido por dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta (PZ) de nanopartículas de quitosanos (NPQs) y nanopartículas de quitosano con insulina (NPQIs) a un pH 5.3 a 25 °C.....	53
Tabla 4.- Parámetros termodinámicos de interacción entre la insulina y el quitosano en la formación de nanopartículas de quitosano-insulina.	69
Tabla 5.- Resultados de la eficiencia de asociación (AE) y eficiencia de carga (LE) en diferentes pH de los NPQIs obtenidos a temperatura ambiente.....	72
Tabla 6.- Diámetros promedios de NPQs y NPQIs formadas siguiendo el método alternativo. En donde el control del pH de las soluciones de quitosano fue controlado. En la tabla se muestra el efecto de la agitación por sonicación, empleado con la intención de disminuir los diámetros promedios.	92

Resumen

En este trabajo de investigación se estudió la influencia de la modificación hidrofóbica del biopolímero quitosano en la formación de nanopartículas (NPs) complejadas con la proteína insulina. Este sistema es propuesto como vehículo de transporte, y liberador *in situ* del fármaco en tratamientos alternativos (oral o nasal) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

La modificación hidrofóbica del quitosano se realizó mediante una reacción de alquilación sustituyendo en ion amino del biopolímero, cadenas hidrocarbonadas de aldehídos, de diferentes pesos moleculares (8, 10 y 12 carbonos) y en diferentes porcentajes de sustitución (5, 10 y 50 %), logrando obtener una variedad de quitosanos derivatizados con la finalidad de modular las interacciones hidrofobicas con la proteína. La formación de nanopartículas se desarrolló con la técnica de gelificación ionotrópica utilizando tripolisofato pentasódico (TPP) como agente iónico y precursor de la formación de las NPs de quitosano. En esta etapa, se emplearon diferentes valores de pH logrando obtener NPs por debajo de los 300 nm de diámetro, característica deseable en la compatibilidad fisiológica. Con la finalidad de determinar la consecución de la reacción de derivatización se utilizaron las técnicas de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) y espectroscopía de infrarrojo (FT-IR), esta última además se empleó para identificar la asociación de la insulina en las nanopartículas insulina-quitosano. Los tamaños y carga superficial de las NPs se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta (PZ), respectivamente, encontrando que las NPs formadas con los quitosanos derivatizados se obtienen en general NPs de menor tamaño y con mayor carga superficial, idóneo en las capacidades de bioadhesividad del sistema.

Además, se observó mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) que las NPs hechas con los quitosanos derivatizados presentan formas ovoide, efecto asociado a la estructuración propiciada por las cadenas hidrófobas presentes en el quitosano derivatizado. También se realizaron mediciones de tensiometría de gota (TG) con el objetivo de caracterizar el efecto hidrofóbico en las propiedades reológicas interfaciales en la interfase aire-líquido. El estudio de calorimetría de titulación (ITC) se utilizó con la finalidad de comprender termodinámicamente el tipo de interacción entre los diferentes componentes presentes en la síntesis de las nanopartículas insulina-quitosano. Mientras que la eficiencia de asociación y de carga del fármaco en las NPs se estudió en diferentes condiciones para determinar las condiciones óptimas de acomplejación. Estos resultados muestran que las NPs formadas con quitosanos hidrofobizados poseen mayor eficiencia de asociación y de capacidad de carga de la insulina a pH 6.0 en comparación con las NPs de quitosano sin modificar. También se desarrollaron estudios de la cinética de liberación *in vitro* en soluciones acuosas en diferentes pHs de solución (pH 5.3, 6.0 y 7.4), los cuales muestran que la cinética de liberación de la insulina es controlada y sostenida con las NPs hechas con quitosanos hidrofobizados. Por último se realizaron experimentos de dicroísmo circular (CD) de la insulina tras los estudios de liberación. Estos resultados confirman que la proteína mantiene su estructura nativa, sugiriendo que la insulina conserva su funcionalidad biológica tras la acomplejación al mantener su estructura secundaria y terciaria sin alteraciones. Esta serie de resultados muestran que la formación de NPs insulina-quitosano modificado hidrofóticamente tiene potencial para emplearse como sistema de liberación del fármaco en tratamientos contra el padecimiento de la diabetes mellitus tipo 2.

Abstract

In this research, we studied the influence of hydrophobic modification of the biopolymer chitosan in the formation of nanoparticles (NPs) complexed with the protein insulin. This system is proposed as a transport vector nanocarrier, and delivery vector of the drug *in situ* treatments (oral or nasal) in patients with type 2 diabetes mellitus.

The hydrophobic modification of chitosan was performed by mean of alkylation reaction in the polymer ion amino, with aldehyde molecules of different molecular weights (8, 10, 12 carbons) and different substitution ratios (5, 10, 50 %). We obtained a variety of derivatized chitosans with the aim of modulating hydrophobic interactions with the protein. Nanoparticle formation was developed with the ionotropic gelation technique using pentasodium tripolyphosphate (TPP) as ionic agent and formation of the NPs precursor. In this stage, different formulations were used to obtain NPs under 300 nm of diameter varying the pH solutions, characteristics desirable in the physiological compatibility. In order to determine the success of the derivatization reaction we used nuclear magnetic resonance (NMR) and infrared spectroscopy (FT-IR), the latter also was used to identify the association of insulin in complexation. The sizes and surface charge of the NPs was obtained by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential (PZ), respectively, finding that the NPs formed with derivatized chitosans are generally obtained with adequate bioadhesiveness, and greater surface charge in system capabilities. Furthermore, it was observed by atomic force microscopy (AFM) and transmission electron microscopy (TEM) that the NPs made derivatized chitosans have ovoid shapes, associated effect brought about by the hydrophobic

chains present chitosan derivatized. Surface tension measurements were also performed by drop tensiometry (TG) with the objective of characterizing the hydrophobic effect on the interfacial rheological properties at the air-liquid interface. Isothermal titration calorimetry study (ITC) was employed to comprise the thermodynamic of interaction between the different components present in the synthesis of insulin-chitosan complex. While the association efficiency of drug loading and the NPs in different formulations were studied to determine the optimum conditions for complexation. These results show that the NPs formed with hydrophobic chitosans have the best association efficiency and loading capacity of insulin at pH 6.0 in comparison with the unmodified chitosan NPs. Also we developed studies of insulin release *in vitro* in aqueous solution at different pH (5.3, 6.0 and 7.4), which showed that the release profiles of insulin were monitored and maintained with the NPs made with hydrophobic chitosans. Finally, circular dichroism (CD) experiments of insulin release were performance. These results confirm that the protein retains its biological functionality after complexation to maintain its secondary and tertiary structure unaltered. This series of results showed that the complexation of NPs insulin hydrophobically modified chitosan has been potential for use as drug delivery system in treatments of type 2 diabetes mellitus.

Objetivos

General

Estudiar la interacción de la proteína insulina complejadas con quitosano modificado hidrofóbicamente en la formación de nanopartículas.

Particulares

- Modificar hidrofóbicamente el biopolímero quitosano por reacción de alquilación adicionando cadenas carbonadas de aldehídos de diferentes pesos moleculares (8, 10 y 12 carbonos) y variando el grado de sustitución (5, 10 y 50 %).
- Obtener nanopartículas con los quitosanos derivatizados complejo con la proteína insulina, en diferentes condiciones de pH para determinar las condiciones óptimas para obtener tamaños en la escala mesoscópica.
- Determinar los tamaños efectivos, morfología y carga superficial de los agregados poliméricos y de las nanopartículas insulina-quitosano, utilizando dispersión dinámica, potencial zeta, microscopia de fuerza atómica y microscopía electrónica de transmisión.
- Estimar el efecto asociativo inducido por la modificación hidrofóbica del quitosano, utilizando la técnica del tensiómetro de gota.
- Determinar y cuantificar el tipo de interacciones, inter e intramoleculares, responsables de la formación de las nanopartículas cargadas con insulina mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica.

- Obtener la eficiencia de asociación y la eficiencia de carga de las nanopartículas complejadas con la proteína en las diferentes condiciones de obtención de las nanopartículas.

- Determinar la cinética de liberación de proteína *in vitro* en soluciones acuosas con diferentes pH y a temperatura corporal.

- Determinar el efecto sobre la estructura secundaria y terciaria de la proteína insulina, por efecto de la interacción con los grupos hidrofóbicos del quitosano modificado, mediante dicroísmo circular.

Capítulo I

1 Introducción

En los últimos 30 años se ha desarrollado intensamente la investigación de nuevos materiales que ayuden a la liberación controlada de diferentes fármacos como: proteínas, péptidos o drogas. Estos materiales denominados biomateriales resultan de gran interés en la industria farmacéutica por la fácil degradación y baja toxicidad que representan en el tratamiento de algunos padecimientos humanos como la diabetes, cáncer, problemas del corazón, asma, etcétera ¹⁻².

Particularmente, en el tratamiento de la diabetes se utiliza la proteína insulina para regular el metabolismo celular de la glucosa, haciendo que personas insulino dependientes tengan que inyectarse la proteína directamente al tejido muscular en varias ocasiones al día, afectando la calidad de vida del individuo. Para personas con diabetes mellitus tipo 2 se ha desarrollado tratamientos alternativos, proponiendo la administración oral y nasal de la insulina, sin embargo estos métodos resultan poco efectivos si la proteína esta desprotegida de agentes agresivos como los ácidos gastrointestinales, la degradación enzimática o una pobre adhesividad en la membrana celular³.

Los polímeros con propiedades anfífilas son utilizados con la finalidad de proteger y emplearse como medio de transporte del fármaco a través del cuerpo humano. Estos materiales poseen grupos con afinidad (hidrofílico) y grupos con poca o nula afinidad (hidrofóbico) en un solvente polar (agua), otorgando al sistema propiedades auto-asociativas que conducen a la formación de agregados⁴. Estas cualidades justifican el estudio de la interacción de la insulina con el biopolímero quitosano modificado hidrofóticamente, para estimar la eficiencia de este

biomaterial como sistema de liberación y protección de fármacos y evaluar la posible desnaturalización de la insulina al anclarse con los agregados poliméricos. La seguridad de estos sistemas aún no ha sido completamente probada, en especial nanopartículas a base de polímeros. Sin embargo, las nanopartículas poliméricas han demostrado ser una alternativa interesante para hacer frente a algunas dificultades asociadas a la administración del fármaco mediante la modulación sus propiedades fisicoquímicas⁵⁻⁷. Por ejemplo, las nanopartículas poliméricas se han utilizado para aumentar la concentración de fármacos pocos solubles en soluciones acuosas, mejorando la biodisponibilidad y el tiempo de residencia en el organismo⁸⁻⁹. Además, la escala de tamaño y área superficial de las nanopartículas poliméricas favorece a la absorción o adsorción del fármaco en comparación con otros sistemas de transporte y entrega de fármacos¹⁰. Las nanopartículas proporcionan mayor estabilidad y protección de los fármacos en los diferentes fluidos biológicos, teniendo una mejor biodistribución, una cinética de liberación sostenida y reducidos efectos secundarios¹¹.

En este trabajo, investigamos las interacciones y propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas formadas con quitosanos modificados hidrofóticamente y su asociación con la insulina, a fin de realizar una evaluación *in vitro* y determinar su potencial como sistema de transporte y liberación de fármaco en administración oral y/o nasal. Por otra parte, se obtuvo un sistema polimérico con la capacidad de modular y controlar la administración de la insulina en diferentes pH, y reducir así, las fases de liberación rápida presente en sistemas de nanopartículas hechas con quitosano sin modificar. Las propiedades hidrofólicas del quitosano derivatizado fueron aprovechadas para mejorar la biodisponibilidad del fármaco, así como controlar su perfil de liberación y mejorar su tiempo de residencia. Dicha propiedad

hidrofóbica, se logró mediante la reacción de alquilación, adicionando en los iones aminos del quitosano, cadenas hidrocarbonadas de aldehídos de diferentes pesos moleculares (8, 10 y 12 carbonos) y en diferentes proporciones de sustitución (5, 10 y 50 %)¹²⁻¹³. La síntesis de las nanopartículas se realizó con la técnica de gelificación ionotrópica.

La estructura de la tesis consta de una breve presentación de los antecedentes descritos en el segundo capítulo, acerca de las investigaciones desarrolladas entorno a los diferentes sistemas de liberación de fármacos, así como una recapitulación de las características del quitosano, y de la proteína insulina. El tercer capítulo se reserva a la sección experimental en donde se detalla las reacciones de alquilación y de gelificación ionotrópica utilizadas en la modificación hidrofóbica del quitosano y en la formación de las nanopartículas. También en este capítulo se describen los instrumentos empleados en los experimentos y las condiciones de las muestras en que fueron analizados. En el cuarto capítulo se describen los resultados obtenidos en los diferentes experimentos, organizados en las distintas etapas en la que se desarrolló la investigación. En la primera sección del cuarto capítulo se describen los resultados obtenidos de las técnicas experimentales de resonancia magnética nuclear y espectroscopia de infrarrojo, las cuales se utilizaron para determinar la consecución de la reacción de alquilación realizada al biopolímero. También en esta primera sección, se muestra la caracterización realizada a los quitosanos derivatizados con la técnica de tensiometría de gota, con la finalidad estimar el efecto de la adición de los grupos hidrofóbicos en el quitosano, midiendo las propiedades interfaciales de las suspensiones acuosas de los polímeros derivatizados en la interfase aire-líquido. En la segunda sección del cuarto capítulo, se presenta la caracterización espectroscópica (FT-IR) realizada a las nanopartículas formadas

mediante la gelificación ionotrópica, con el objetivo de determinar el éxito de la acomplejación insulina-quitosano. En la tercera sección del cuarto capítulo, se muestran los resultados de las caracterizaciones de las propiedades fisicoquímicas de las NPs. Los tamaños de las nanopartículas se midieron con dispersión dinámica de luz y la cuantificación de la carga superficial mediante la técnica de potencial zeta. La morfología de las nanopartículas fue observada por microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fuerza atómica. En la cuarta sección del cuarto capítulo, se reserva para presentar el estudio termodinámico realizado para comprender el proceso de la acomplejación mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica, con la finalidad de identificar y cuantificar el tipo de interacciones tanto inter como intramoleculares de los diferentes componentes que forman las nanopartículas. En la quinta sección del cuarto capítulo se detallan los resultados obtenidos de los estudios de la eficiencia de asociación y de la eficiencia de carga de las nanopartículas. Así como la cinética de liberación *in vitro* de la insulina, de las NPs suspendidos en soluciones acuosas con diferentes pH, durante un periodo de tiempo determinado. En la sexta sección del cuarto capítulo, se muestran los resultados obtenidos de dicroísmo circular realizados a las soluciones de la insulina obtenida tras la liberación *in vitro*, con la finalidad de determinar si la estructura nativa de la proteína se mantiene después de los procesos de acomplejación y liberación, y así, por consiguiente determinar si su funcionalidad biológica se preserva. Por último, en el quinto capítulo se definen las conclusiones de los resultados obtenidos en esta investigación.

Capítulo II

2 Antecedentes

Recientemente Varshosaz *et al.*¹⁴ publicaron el estado del arte de los diferentes sistemas de liberación de la insulina para el tratamiento de la diabetes mellitus: Oral, pulmonar, dental, etcétera. En este trabajo se refuerza la importancia de encontrar nuevos materiales con la finalidad de proteger y controlar la liberación de la insulina en el cuerpo humano. En el caso de los tratamientos orales y nasales, el fármaco queda expuesto a diferentes amenazas como el ácido gastrointestinal o enzimas naturales que provocan la desnaturalización y degradación de la proteína, desactivando su función biológica en el metabolismo celular². Por otra parte en los tratamientos pulmonares y nasales el reto consiste en asegurar el anclaje a las paredes del epitelio nasal para que el fármaco pueda ser suministrado, además de controlar la cantidad efectiva de insulina suministrada al cuerpo.

En el trabajo presentado por Pasquali *et al.*⁴, se expone la utilidad de los polímeros anfifílicos, para el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos. Este interés radica en las propiedades auto-asociativas de los polímeros y la facilidad de estos sistemas para formar agregados tipo micelares, vesículas, partículas, etc., en presencia de solventes polares como el agua¹⁵⁻¹⁷. Sin embargo, la interacción del quitosano modificado hidrofóbicamente con la insulina aún no ha sido bien elucidada y en la literatura se encuentra pocos estudios de la interacción de los grupos hidrófobos con las diferentes estructuras de la proteína insulina.

El quitosano modificado hidrofóbicamente aumenta las propiedades asociativas del polímero y sigue preservando las propiedades de un polielectrolito, sensible a la variación del pH en solución. Esta característica es indispensable en los sistemas de liberación de fármacos,

debido a que la formación y degradación de la nanopartícula será dependiente de la característica del solvente, permitiendo entregar el fármaco en el lugar específico del tratamiento¹⁸. El estudio del comportamiento de la insulina disuelta en soluciones con diferentes pH y concentraciones de iones salinos es importante, debido a que en la estructura primaria de la proteína se encuentran iones negativos que interactúan con las moléculas del solvente¹⁹. Estos factores pueden ser determinantes al momento de depositar el vehículo en la zona de absorción del fármaco. Por ejemplo, Losche *et al.*²⁰, reportaron la formación de monocapas de diferentes tipos de proteína en interfases líquido-líquido y aire-líquido. Dependiendo de las características del polímero utilizado para acomplejar la proteína insulina, este tendrá un determinado tipo de penetrabilidad en las membranas celulares²¹⁻²². En años recientes, un gran número de sistemas poliméricos de nanopartículas cargados con insulina, han sido desarrollados²³⁻²⁵. Sin embargo, la mayoría de estos sistemas presentan problemas, como una baja resistencia a los diferentes ambientes del tracto gastrointestinal, baja absorción en el epitelio celular, baja eficiencia en la asociación de la insulina o la existencia de fases de liberación rápida del fármaco evitando que se aproveche en el organismo o causando sobrecarga del medicamento. Por esta razón, diversos investigadores han explorado la alternativa de desarrollar nuevos materiales que permitan una bioadhesividad en la mucosa nasal o paredes intestinales y mejorar la adsorción de la proteína y alcanzar concentraciones óptimas de insulina que permitan mantener los índices glucémicos estables²⁶⁻²⁸. Así el quitosano modificado hidrofóbicamente resulta ser un excelente candidato a ser empleado para este fin. Este biopolímero al ser un polielectrolito catiónico, presenta propiedades muy deseables en los materiales utilizados como vehículos de fármacos, tales como, la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y bioadhesividad²⁹⁻³⁰. Además, el quitosano es

biológicamente inerte, seguro para el uso humano y estable en condiciones fisiológicas³¹. Estas características mencionadas hacen que el quitosano sea adecuado en el uso de un gran número de aplicaciones biomédicas, incluyendo la regeneración de tejido y por supuesto como transportador de diversos medicamentos e incluidos, los fármacos empleados en terapia génica³²⁻³⁸. También el quitosano ha pasado por una gran cantidad de modificaciones intentando potencializar las características antes mencionadas y así, mejorar su eficiencia. Por ejemplo, intentando regular y mejorar la cinética y liberación de fármacos, el quitosano se ha derivatizado con moléculas tales como ácido desoxicólico³⁹⁻⁴⁰ y el ácido linoleico⁴¹⁻⁴². En particular, Zhang *et al.*⁴³, encontraron que para quitosanos derivatizados con cadenas adicionales de oleoil con alta hidrofobicidad, ayudaban a estabilizar las nanopartículas y a protegen mejor al fármaco doxorubicina, un medicamento empleado en el tratamientos contra el cáncer. Recientemente, Sonia *et al.*⁴⁴, demostraron que este tipo de derivatización a pesar de tener buenas propiedades mucoadherentes, liberaban cerca del 90 % de la insulina en las primeras cinco horas a un pH 7.4. Mientras que en el trabajo de Jo *et al.*⁴⁵, presentaron que el quitosano derivatizado con moléculas de glicol mantenía un perfil de liberación de la insulina de manera controlado y con mayor biodisponibilidad en estudios *in vivo* respecto al quitosano sin modificar. Sin embargo, estas nanopartículas presentaban baja eficiencia de asociación, cercana al 20 %. Estos antecedentes nos muestran la relevancia de desarrollar nuevos materiales capaces de combinar diferentes características, con propiedades que puedan permitir el transporte, anclaje, liberación y permanencia del fármaco en el organismo.

2.1 Quitosano.

El quitosano es un derivatizado de la quitina. La quitina, poli[β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glucopiranos] (ver Figura 1), es el componente orgánico más abundante en la estructura esquelética de las muchas clases que conforman al grupo de los invertebrados, por ejemplo, los moluscos y los artrópodos⁴⁶. Además, la quitina se encuentra presente en algunos hongos y en algas como las diatomeas. Incluso, es la segunda sustancia orgánica más abundante después de la celulosa. Y es producida por biosíntesis en los organismos antes mencionados³⁰.

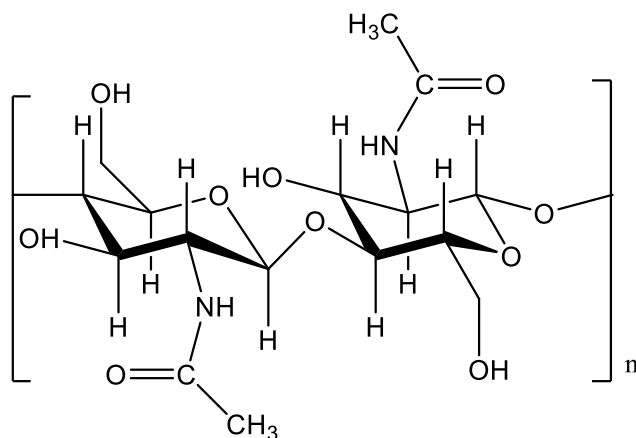


Figura 1.- Quitina.

Cuando la quitina se somete a la acción de un medio alcalino muy concentrado, y a temperaturas superiores a los 60 °C, se produce una reacción de desacetilación. Esta reacción consiste en la pérdida del grupo acetyl de la amida del carbono 2, dejando un grupo amino en esa posición. El producto de la reacción se denomina quitosano y presenta propiedades significativamente diferentes a la quitina. El quitosano constituye así, el derivado más importante de la quitina⁴⁷.

El quitosano, poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranos] (ver Figura 2), existe en baja concentración en la quitina nativa y es producida en diferentes grados de desacetilación. También está en forma natural en algunos hongos, pero siempre en menor proporción que la quitina. Este polímero no se presenta como una sola molécula. Muestra variabilidad no solamente en el tamaño de las cadenas, sino también en el grado de acetilación de las mismas. Esta variabilidad nos obliga a usar, para estos biopolímeros, valores tanto de peso molecular, como grados de desacetilación promedios. El grado de desacetilación identifica la concentración relativa de grupos amino en el polímero. Cuando el polímero contiene menos del 40 % de grupos acetilo, podremos llamarlo quitosano o quitosano con grado de desacetilación del 60 %. Además el quitosano es el único polisacárido catiónico natural, ello le confiere características especiales que lo hacen útil en numerosas aplicaciones. En su estructura, el nitrógeno se encuentra como una amina alifática primaria y origina reacciones típicas como la de N-acilación y la formación de bases de Schiff, entre otras^{31,46}.

El quitosano, al ser una base, forma sales con ácidos y origina polielectrolitos cuya solubilidad está en función de la naturaleza del anión involucrado, del grado de desacetilación, del peso molecular del polímero y de la temperatura. Así, el quitosano puede ser solubilizado en diferentes medios como el ácido acético. Como en otros polielectrolitos, su fuerza de disociación pK_a , presenta cierta variabilidad, dependiendo de las condiciones en las que se determine. Los valores de pK_a oscilan entre los 6.0 y 6.8⁴⁸.

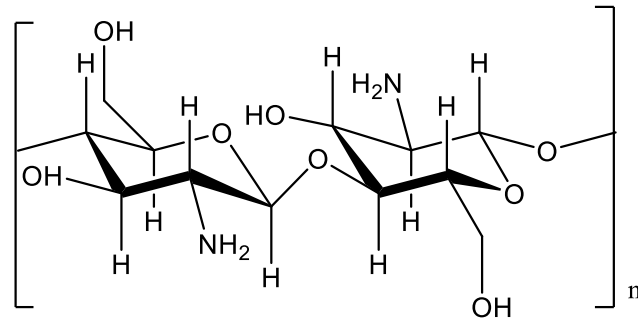


Figura 2.- Quitosano.

2.2 Insulina.

La glucosa es un carbohidrato y es la principal fuente de combustible celular. Ésta, es metabolizada en las células para proveer adenosín trifosfato (ATP)⁴⁹. Esta molécula es el equivalente al cambio de moneda energético en la sangre, al ser utilizada por los organismos vivos para proporcionar la energía necesaria en las reacciones metabólicas. Además, la glucosa representa la principal fuente de carbono para la mayoría de las funciones celulares. Esto incluye la síntesis de macromoléculas como el ADN, ARN y las proteínas. También desempeña un papel fundamental en el transporte de macromoléculas a través de las membranas celulares, es decir, en la exocitosis y endocitosis. El ATP es producido mediante el ciclo de Krebs, una ruta metabólica presente en la respiración celular donde se produce la energía en las células. El ciclo de Krebs forma parte de la respiración aeróbica, es decir, se realiza en presencia de oxígeno y se desarrolla entre los procesos de la glicólisis y cadena respiratoria. Su fin es la obtención de la NADH deshidrogenasa, una molécula con poder reductor empleado en la obtención del ATP⁵⁰.

La insulina es la hormona predominante junto con el glucagón en el control de la concentración de glucosa en la sangre. Esta hormona es secretada como un polipéptido por las células- β de los islotes pancreáticos de Langerhans y es liberada al torrente sanguíneo después de la hidrólisis de conexión peptídica en respuesta de un aumento de glucosa en la sangre. La insulina es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos, los cuales forman una doble cadena (cadena A y B) unida por dos puentes disulfuro (ver Figura 3*).

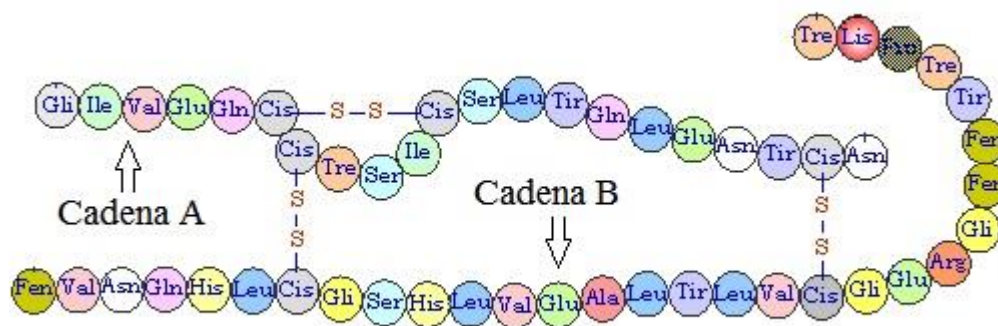


Figura 3.- Insulina Humana (estructura primaria).

* Fuente: <http://agendaquimica.blogspot.mx>

Capítulo III

3 Experimental

Este capítulo está organizado en cuatro secciones. La primera sección se reserva para describir los materiales utilizados en las reacciones de derivatización y síntesis de las nanopartículas, así como los procedimientos de limpieza de material y elaboración de muestras utilizadas en los diferentes experimentos. En la segunda sección se detalla el procedimiento químico realizado para la obtención de los quitosanos derivatizados. La tercera sección se utiliza para mostrar la reacción físico-química empleada para la elaboración de las nanopartículas complejadas con insulina. Por último, en la cuarta sección se especifica los instrumentos de mediciones utilizados para la caracterización de los polímeros derivatizados y los diferentes estudios realizados a las nanopartículas insulina-quitosano.

La modificación química del quitosano, la formación de las nanopartículas, la caracterización por dispersión dinámica de luz y microscopía de fuerza atómica se realizaron en el laboratorio de flúidos complejos del Departamento de Física. La caracterización espectroscópica de los quitosanos derivatizados, las nanopartículas y de la insulina liberada con las técnicas de resonancia magnética nuclear, infrarrojo, y dicroísmo circular se realizaron en el Departamento de Investigación de Polímeros y Materiales. Los estudios de eficiencia de asociación y eficiencia de carga de las nanopartículas insulina-quitosano, así como los estudios de liberación *in vitro* de la insulina se desarrollaron en el laboratorio de biomateriales en el Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, en Hermosillo, Sonora, México. Los estudios de calorimetría de titulación isotérmica, las mediciones de potencial zeta y la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de

transmisión de las nanopartículas se realizaron en el laboratorio de física de coloides y polímeros del Departamento de Física de la Materia Condensada en la Universidad de Santiago de Compostela, en Santiago Compostela, España.

3.1 Materiales.

Para la derivatización de los polímeros, se utilizó un quitosano (peso molecular promedio de 415,000 g/mol) con un grado de desacetilación del 90 % proveído por la compañía Fluka[®] (n.º 28191, de viscosidad media). El resto de los reactivos utilizados fueron adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich[®]. Los sustituyentes utilizados fueron octilaldehído (n.º O5608), decilaldehído (n.º D7384) y dodecilaldehído (n.º D222003) con grado de pureza de 99 %. Para el control de la reacción se utilizó cianoborohidruro de sodio (NaBH₄CN) con una pureza del 95 % (n.º 156159). Para la síntesis y complejación de las nanopartículas se utilizó insulina humana recombinante (1 mg equivale a 29.1 U.I.), y tripolifosfato pentasódico (TPP) con una pureza del 98 % (n.º 72061). Para la preparación de las muestras y las diferentes disoluciones, se empleó agua con calidad ultra pura obtenida de un instrumento Easypure[®] (Thermo-Scientific Barnstead, EE. UU.), con una resistividad de 18.2 MΩ·cm. El resto de los reactivos orgánicos (etanol, ácido acético, ácido clorhídrico, etc.) empleados en este trabajo fueron de calidad HPLC.

El procedimiento para el lavado del material de vidrio se inicia con un enjuague abundante con agua corriente para eliminar residuos de polvo, después se prosigue con un lavado en jabón suave de la marca Alconox[®] con un pH 9.5. Posteriormente se enjuaga varias veces con agua destilada y deionizada. Por último se baña en etanol y se deja secar en horno a

una temperatura aproximada de 70 °C. Los porta muestras utilizados en los experimentos de dispersión de luz recibieron un tratamiento diferente. Se inicia con un enjuague en agua corriente y se dejan reposar en una mezcla jabón/agua de la marca Hellmanex® al 2 % v/v, precalentado junto con los porta muestra a una temperatura de 30 °C por 2 horas. Después se enjuaga varias veces con agua deionizada y etanol, finalizado con un secado en horno a una temperatura de 60 °C durante 4 horas para después almacenarlos en una caja de aislamiento de la marca Nalgene®⁵¹.

Para la preparación de las muestras se utilizó agua deionizada y filtrada utilizando un filtro de la marca Whatman® de polifluoruro de vinilideno (con un poro de 0.2 µm, modelo w/GMF), con la finalidad de evitar cualquier residuo de polvo.

3.2 Derivatización del Quitosano.

La derivatización de los quitosanos se realizó mediante una reacción de aminación reductiva, siguiendo el procedimiento descrito por Rinaudo *et al.*⁵², el cual crea un enlace covalente entre el aldehído con la amina presente en la cadena polimérica del quitosano (ver Figura 4).

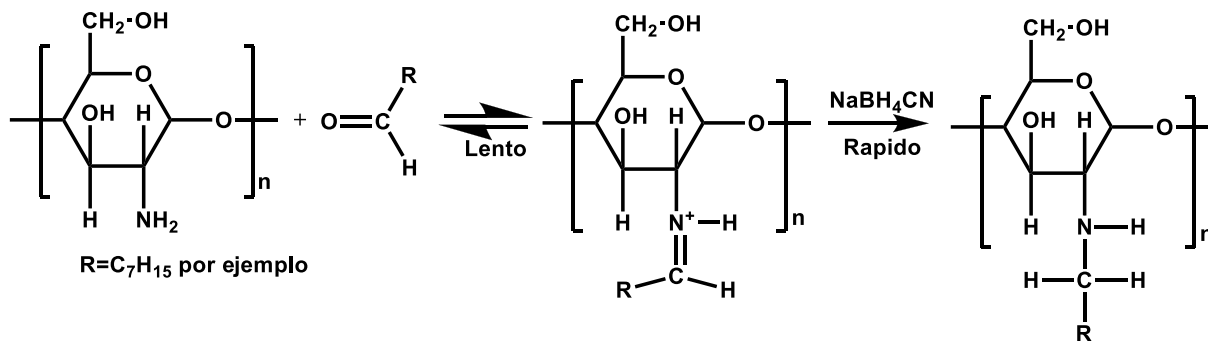


Figura 4.- Reacción de derivatización del quitosano.

El procedimiento de reacción de alquilación consta de seis etapas (ver Figura 5): (1) se inicia disolviendo 2 g de quitosano en 110 mL de ácido acético (0.2 M). Posteriormente se prepara la solución del quitosano agregando 75 mL de etanol con la finalidad de propiciar un medio solvatado para la incorporación del aldehído. El pH se ajusta[†] a 5.1 para evitar la precipitación del quitosano. (2) El aldehído se incorpora en una proporción de sustitución adecuada (5, 10 ó 50 %) diluido 35 mL de etanol y se agrega a la solución de quitosano.



(1) solución del Quitosano



(2) Adición del aldehído y NaBH₄CN



(3) Transcurrido 24 hrs



(4) Precipitación en etanol



(5) Lavados etanol/agua



(6) Producto final

Figura 5.- Etapas de la reacción para la obtención del quitosano derivatizado.

[†] Las soluciones empleadas para ajustar el pH en las diferentes fases del experimentos fueron las siguientes: solución de HCl a 0.01 M, solución de NaOH a 0.1 N y solución de AcOH a 0.2 M.

Después, Se sigue con un exceso de cianoborohidruro de sodio (3 moles por mol de quitosano) disuelto en 40 mL de etanol y se incorpora a la solución de quitosano. (3) La reacción se mantiene bajo agitación magnética durante 24 h a temperatura ambiente. (4) Una vez transcurrido este tiempo la reacción se precipita lenta y continuamente en etanol bajo agitación constante. (5) Se ajusta el pH a 7 y se lava el precipitado varias ocasiones con una mezcla de etanol/agua, aumentando el contenido de alcohol de 70 al 100 % v/v. (6) Se finaliza liofilizando el producto por 24 h, triturándolo y almacenándolo para su caracterización.

3.3 Síntesis de Nanopartículas.

Las nanopartículas de quitosano (NPQs) y quitosano-insulina (NPQIs) se sintetizaron mediante la técnica de gelificación ionotrópica previamente descrita por Alonso *et al.*⁵³, con ligeras modificaciones para lograr la solubilidad de los quitosanos derivatizados. El procedimiento para la síntesis de NPs es el siguiente: el quitosano se disuelve (1 mg/mL) en ácido acético (6 mM), mientras el TPP (0.5 mg/mL) en NaOH (10 mM). Para las NPQs, la solución de TPP se agrega directamente en la solución de quitosano (ver Figura 6). Mientras que, para la formación de NPQIs, se disuelve la insulina (1 mg/mL) en una solución de HCl (10 mM). Posteriormente se toman 2 mL de la solución de insulina y se mezcla con 1 mL de la solución de TPP, esta mezcla se agrega gota a gota en 4 mL de la solución de quitosano. Para controlar el pH final de la suspensión de las NPQs y NPQIs, se ajusta el pH de las soluciones de TPP o insulina/TPP previo a la incorporación gota a gota en la solución de quitosano. Todo el proceso de síntesis se hace bajo agitación magnética (500 rpm) durante un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente. Después de transcurrido este periodo de tiempo, se mide el pH final de la suspensión de las nanopartículas y se les caracterizan inmediatamente.



(1) Solución de Quitosano



(2) Posterior a la adición de la solución de TPP o insulina/TPP

Figura 6.- Imágenes ilustrativas del proceso formación las NPs por gelificación ionotrópica.

3.4 Instrumentos de Medición.

3.4.1 Resonancia Magnética Nuclear.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) se obtuvieron en un instrumento Bruker[®] (modelo Avance 400) operando a 400 MHz, utilizando como disolvente $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ al 2 % v/v a pH 3.2. Las muestras se prepararon disolviendo 5 mg de los diferentes quitosanos en 0.5 mL del disolvente a 40 °C. Los diferentes espectros se tomaron a temperatura ambiente (ver Figura 7).

3.4.2 Espectroscopía de Infrarrojo.

Los espectros de infrarrojo (FT-IR) de los quitosanos derivatizados, las nanopartículas de quitosano y quitosano-insulina se obtuvieron en un instrumento Perkin-Elmer[®] modelo Spectrum GX (ver Figura 8). Cada espectro es el promedio de 16 corridas detectando la transmitancia en el rango de 400-4,000 cm^{-1} con una resolución espectral de 4 cm^{-1} y

analizado con el software Spectrum v.10. Tanto las muestras de quitosano, como las de nanopartículas fueron liofilizadas y mezcladas con KBr para formar una pastilla, previo a las mediciones de FT-IR. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente.



Figura 7.- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear de la marca Bruker (modelo Avance 400).



Figura 8.- Espectrómetro de infrarrojo de la marca Perkin-Elmer (modelo Spectrum GX).

3.4.3 Tensiometría de Gota.

Para los experimentos de tensiometría de gota se utilizó un instrumento modelo Tracker de la marca I.T. Concept® (Francia), con la capacidad de calcular en tiempo real la tensión superficial con una precisión de 0.1 mN/m. La medición de la tensión superficial y las mediciones de reología interfacial se basan en el análisis de un perfil digital de la imagen de la gota y de la solución de la ecuación de Gauss-Laplace. Se utilizó el software “Win Drop” (I.T. Concept®) para el análisis del perfil de la gota. Para los experimentos de tensiometría dilatacional en la interfase aire-líquido de las suspensiones de quitosano, se empleó una aguja de acero en forma de “U” (con un diámetro de 0.5 mm) sumergida en la suspensión acuosa. Esta suspensión se colocó en una cubeta de cuarzo (103.051 F-Og, 20-10, Hellma, Alemania) a temperatura ambiente. La gota flotante se generó mecánicamente con un volumen de 8 µL con una variación del 10 %. En esta variación dinámica se generaron deformaciones sinusoidales en periodos de 1, 1.3, 2, 4, 10, 13 y 20 s a temperatura ambiente. Las condiciones de estas mediciones se realizaron después de haber alcanzado un comportamiento estacionario en la tensión superficial (aproximadamente 1200 s). Una vez transcurrido este tiempo, los parámetros del módulo elástico E' y viscoso E'' se midieron en intervalos de 500 s en modo oscilatorio. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

Los parámetros E' y E'' se obtuvieron de un ajuste a los datos experimentales siguiendo el modelo simple de Maxwell, donde el módulo elástico E' se representa como:

$$E'(\omega) = E_0 + \Delta E \frac{\omega^2 \lambda^2}{1 + \omega^2 \lambda^2}, \quad [1]$$

y el módulo viscoso como,

$$E''(\omega) = \Delta E' \frac{\omega\lambda}{1 + \omega^2\lambda^2}, \quad [2]$$

en donde E'_0 es el valor del módulo elástico extrapolado a $t=0$, λ es el tiempo de relajación característico (cuando $E' = E''$) y ω la frecuencia. Estos parámetros se encuentran ajustando el modelo de Maxwell en el programa de gráficos Origin v.8.0[®].

3.4.4 Dispersión Dinámica de Luz.

Los radios hidrodinámico, R_H se obtuvieron de las mediciones de dispersión dinámica de luz (DLS) realizadas en un instrumento de la compañía ALV-GmbH[®] (modelo ALV-5000/E) acoplado a un correlador digital modelo “ALV-5000 Multiple Tau” (ver Figura 10). Este instrumento está equipado con un láser polarizado verticalmente, con una longitud de onda de 488 nm (2 W). El ángulo de detección se mantuvo a 90° respecto al haz de luz incidente y se realizaron promedios por triplicado de mediciones de 5 corridas con duración de 60 s a temperatura ambiente. Los datos obtenidos de la variación temporal de la intensidad fueron procesados con el algoritmo CONTIN desarrollado por Provencher *et al.*⁵⁴.

3.4.5 Potencial Zeta.

Las mediciones de Potencial Zeta (PZ) de las suspensiones de NPQ y NPQI se realizaron en un equipo Malvern Instruments[®] (modelo Nano ZS). Las muestras fueron depositadas dentro de celdas del tipo capilar-curvo con capacidad de 750 μ L (ver Figura 11). El número de repeticiones por muestra fue establecido por el software y se iniciaron después de haber alcanzado el equilibrio térmico a 25 °C. Cada muestra es analizada por triplicado y en la sección de resultados se muestra el promedio y la desviación estándar de estas mediciones.



Figura 9.- Tensiómetro de gota de la marca I.T. Concept (modelo Tracker).

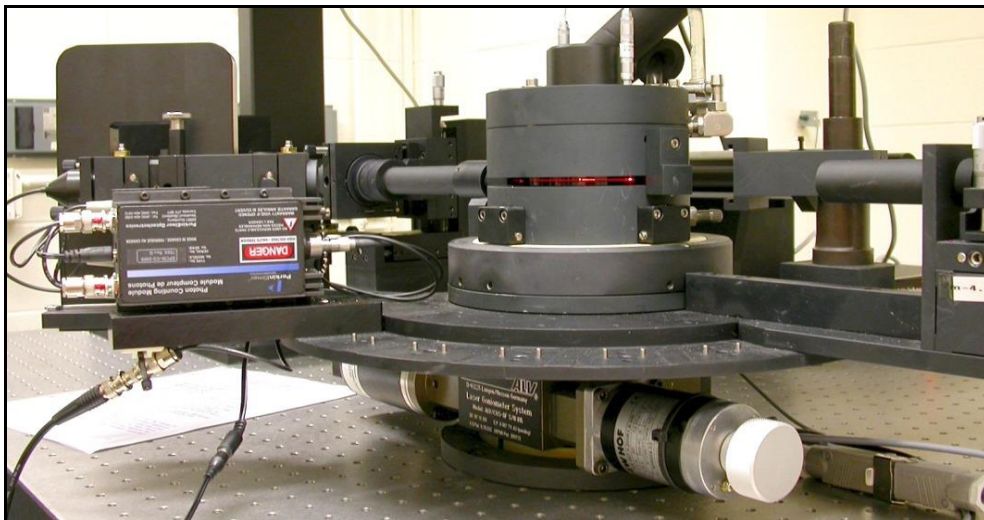


Figura 10.- Dispensador de luz de la marca ALV-GmbH (modelo ALV-5000/E).



Figura 11.- Zetámetro de la marca Malvern Instrumens (modelo Nano ZS).

3.4.6 Microscopía de Fuerza Atómica.

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se obtuvo en un instrumento de la marca JEOL[®], modelo JSPM-4210 (ver Figura 12). Las imágenes fueron tomadas en modo de no-contacto utilizando un cantiléver multipropósitos de silicón s/recubrimiento con resolución lateral de 5 nm (n.º NSC15) de la marca MikroMash[®]. Las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas utilizando el software WSxM v.5.0, desarrollado por Horcas *et al.*⁵⁵. Las muestras fueron preparadas depositando una gota de la suspensión de nanopartículas sobre una mica-sustrato y se dejó secar por un par de minutos para posteriormente proceder a realizar la medición.

3.4.7 Microscopía Electrónica de Transmisión.

Las imágenes de Microscopía de Transmisión (TEM) se obtuvieron en un instrumento Phillips[®] modelo CM-12 operando a un voltaje de aceleración de 120 kV (ver Figura 13). Una gota tomada de la suspensión de NPQs y NPQIs se colocó en un porta muestra de cobre

recubierta con carbón, previamente preparada con un tratamiento especial, el cual incluye el proceso de tinción negativa con un ácido fosfotúngstico al 2 % (m/v) seguido de un lavado con agua deionizada. Posteriormente se dejó secar y se procedió con la examinación de la muestra.



Figura 12.- Microscopio de fuerza atómica marca JEOL (modelo JSPM-4210).

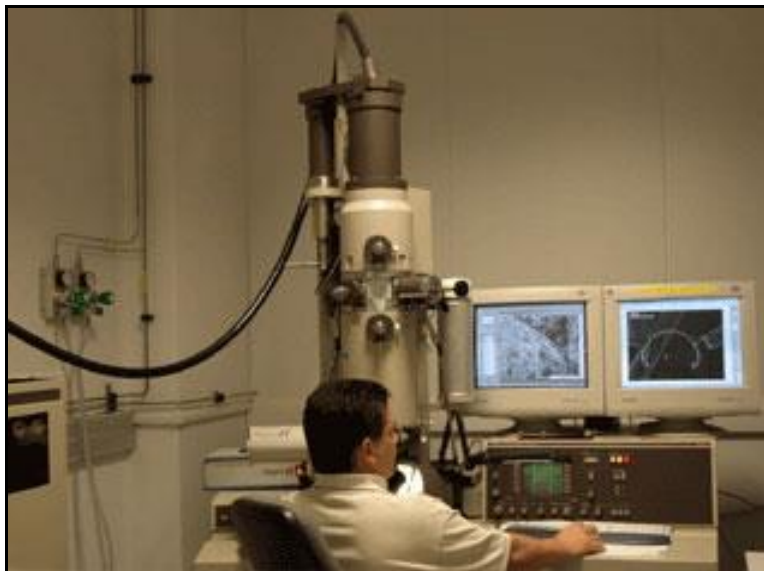


Figura 13.- Microscopio electrónico de transmisión marca Phillips (modelo CM-12).

3.4.8 Calorímetro de Titulación Isotérmica.

Los estudios de calorimetría de titulación isotérmica se realizaron en un microcalorímetro modelo VP-ITC de la marca (MicroCal[®]). En una celda con volumen de 1.436 mL a 25 °C. Las muestras fueron desgasificadas en un sistema Thermo Vac (MicroCal[®]) previo a las mediciones. La celda de medición fue llenada con la solución catiónica de quitosano (8×10^{-4} mM), disuelta en una solución amortiguadora de acetato (pH 4.8), mientras que la celda de referencia se aforó solamente el solvente. La solución aniónica consta de la solución de insulina (0.085 mM) y TPP (2.88 mM) disuelto en 0.01 M (NaOH) a un pH 9.27. La solución aniónica se adicionó dentro de la celda de medición, mediante una jeringa cuya punta gira a 350 rpm. Las revoluciones de agitación fueron lo suficientemente bajas para asegurar que no se formaran burbujas en la solución. Cada titulación consistió en una inyección inicial de 2 μ L (descartada en el análisis), seguida de 23 inyecciones subsecuentes de 12 μ L programadas en intervalos de 400 s. Este tiempo es suficiente para que la señal de calor vuelva a su estado base. Los resultados presentados de estos experimentos están en términos del calor que genera cada inyección, normalizada por la concentración de la insulina adicionada en cada inyección. Es decir el calor molar (Q^*), en función de la relación molar insulina/quitosano. El calor de dilución de las titulaciones de la solución aniónica introducida en la solución catiónica sin quitosano, fue considerado como medición-blanco y sustraído de todas las demás titulaciones. Todas las mediciones se realizaron por duplicado y la reproducibilidad fue del ± 3 %.

Los datos graficados de la unión de ligandos (la insulina en nuestro caso) al quitosano, fue analizado siguiendo la metodología descrita por Alatorre *et al.*⁵⁶⁻⁵⁷, utilizando el programa

MicroCal (Origin v.7.0). Este modelo emplea la ecuación [3] que correlaciona el calor generado por cada inyección, Q , con la estequiometría de unión, n , las fracciones de sitios ocupados, Θ , la concentración de la macromolécula, M , y la entalpía de asociación, ΔH , y el volumen de la celda, V .

$$Q = nVM\Theta\Delta H. \quad [3]$$

Esta ecuación puede resolverse formalmente en función de Θ utilizando la ecuación de equilibrio, utilizando la constante de asociación K_b , donde X es la concentración total de ligandos y $[X]$ es la concentración de ligandos sin unir:

$$K_b = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[X]}; \quad [X] = X - n\Theta M. \quad [4]$$

Para obtener un ajuste adecuado, se realizaron diferentes combinaciones de los parámetros libres de nuestros datos. Estos tres valores fueron alcanzados al encontrar un valor mínimo para la χ^2 , sin tener en cuenta los valores iniciales.



Figura 14.- Microcalorímetro de titulación isotérmica de la marca MicroCal (modelo VP-ITC).

3.4.9 Dicroísmo Circular.

Los estudios de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro de la marca Jasco® (modelo J-810) equipado con el software “Espectra Manager” v.1.53.04 para Windows®. Las mediciones se realizaron en una celda con camino óptico de 0.1 mm y se utilizó una concentración aproximada de 0.1 mg/mL. El equipo fue calibrado con una solución 10-CSA (0.6 mg/mL). Los datos son expresados en elipticidad (mdeg).



Figura 15.- Espectropolarímetro de la marca Jasco (modelo J-810).

3.5 Análisis cuantitativo de la insulina en las NPs.

Para determinar la eficiencia de asociación (AE) y la eficiencia de carga (LE) de la proteína insulina de las nanopartículas formadas con los diferentes quitosanos, se empleó el siguiente procedimiento: (1) posterior a la formación de las NPQIs las muestras se

centrifugaron a una fuerza de $15,000 \times g^{\ddagger}$ (micro centrifuga Beck-man Coulter[®] modelo 22R) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, se recolecto el sobrenadante y se analizó mediante ensayos de proteína Micro BCA (Sigma-Aldrich[®]) con la finalidad de determinar la cantidad de insulina en el sobrenadante. Los ensayos se realizaron en un espectrofotómetro UV-Vis (ver Figura 16). Para este análisis se tomó como dato de referencia el sobrenadante recolectado de las suspensiones de NPQs. Este ensayo se realizó por triplicado, y el promedio con sus respectivas desviaciones estándar se muestran en el capítulo de resultados.

Para calcular las AEs y LEs se utilizaron las siguientes expresiones:

$$AE = \frac{(\text{total de insulina} - \text{insulina en sobrenadante})}{(\text{total de insulina})} \times 100\%, \quad [5]$$

y

$$LE = \frac{(\text{total de insulina} - \text{insulina en sobrenadante})}{(\text{peso de las nanopartículas})} \times 100\%. \quad [6]$$

Donde podría entenderse a la eficiencia de asociación AE como el porcentaje de insulina asociada a la nanopartícula tras el proceso de complejación. Mientras que la eficiencia de carga LE se entiende como la capacidad de las nanopartículas de asociar cierta cantidad de la proteína.

[‡] La fuerza centrífuga relativa (F.C.R.) se define como la fuerza requerida para que se produzca la separación. Las unidades de esta fuerza centrífuga relativa se expresan en el número de veces el valor de la gravedad. Es decir $F.C.R. = G/980 = g$, donde G esta en unidades de cm/s^2 .

3.6 Estudios de liberación *in vitro*.

Los estudios de liberación *in vitro* de la insulina de la nanopartícula polimérica se realizó a temperatura constante (37 °C) y a tres diferentes pH, con la finalidad de analizar la influencia de esta variable en la cinética de liberación de la proteína. Las NPQIs se incubaron a pH 5.6, 6.0 y 7.4 con la finalidad de simular diferentes ambientes de liberación en el organismo, incluyendo la mucosa nasal y el epitelio intestinal⁵⁸⁻⁵⁹. Para este estudio se utilizó buffer de fosfatos para amortiguar el pH de las soluciones preparadas. La concentración de insulina liberada se determinó por triplicado empleando ensayos de proteína Micro BCA (Sigma-Aldrich®) utilizando como calibración la curva estándar de la insulina sin acomplejar. Los ensayos fueron analizados en un espectrofotómetro UV-Vis de la marca Beckman Coulter® modelo AD-340 (ver Figura 16).



Figura 16.- Espectrofotómetro UV-Vis de la marca Beckman Coulter (modelo AD-340).

Capítulo IV

4 Resultados y Discusiones.

En esta sección se presentan los resultados obtenidos de los diferentes estudios realizados en este trabajo de investigación. En la primera sección se presentan las variaciones que se realizaron en la derivatización del quitosano y sus características en particular. También se presentan los resultados espectroscópicos que evidencian la consecución de cada una de las reacciones realizadas y el estudio de tensiometría que muestra el efecto hidrofóbico tras la derivatización en las propiedades interfaciales de soluciones de quitosano. En la segunda sección se reserva para presentar los datos de la síntesis de las nanopartículas y estudio de la asociación quitosano-insulina. En la tercera, se caracterizan las propiedades fisicoquímicas, así como los tamaños y morfologías obtenidas por dispersión de luz, AFM y TEM, así como el potencial zeta. En la cuarta sección se describe el análisis termodinámico, realizado por calorimetría de titulación isotérmica, así como los parámetros termodinámicos obtenidos en este estudio. En la quinta sección se muestran los parámetros de la eficiencia de asociación y de la carga de la insulina en las nanopartículas, así como los perfiles de liberación realizados en diferentes ambientes de pH. Por último, en la sexta sección se presentan los resultados de dicroísmo circular realizados a la insulina liberada, los cuales muestran que la estructura secundaria y terciaria de la insulina se preserva tras el proceso de acomplejación y liberación de la proteína.

4.1 Quitosanos derivatizados.

Mediante la reacción de reducción del grupo amino o ion amonio en la molécula de quitosano, se logró derivatizar una variedad de biopolímeros controlando la proporción del

sustituyente (aldehído) y variando la longitud de la cadena alifática o hidrocarbonada del aldehído. Los resultados se muestran en la Tabla 1: Los diferentes quitosanos son etiquetados para próximas referencias basados en la siguiente codificación: Qm es referido como el quitosano comercial de peso molecular medio utilizado como polímero precursor en la síntesis de derivatización. El número contiguo (8, 10 ó 12) identifica la cantidad de carbonos en la cadena del sustituyente y finalmente las letras (a, b ó c) indican la relación de sustitución porcentual del aldehído (5, 10 ó 50 %, respectivamente) en la cadena polimérica del quitosano. Por ejemplo el quitosano derivatizado con etiqueta “Qm8b” es descrito como el “*quitosano de peso molecular medio sustituido con octilaldehído con una sustitución del 10 %*”.

Tabla 1.- Variedad de quitosanos derivatizados.

N.º	Quitosanos derivatizados	Sustituyente	Grado de sustitución [%]	Grado de sustitución empírico [%]	pK_a
1	Qm	--	--	--	6.5
2	Qm8a	Octilaldehído	5	5.4	6.52
3	Qm8b	Octilaldehído	10	10.8	6.54
4	Qm8c	Octilaldehído	50	44.1	6.8
5	Qm10b	Decilaldehído	10	12.6	6.57
6	Qm12a	Dodecilaldehído	5	4.6	6.53
7	Qm12b	Dodecilaldehído	10	10.9	6.6
8	Qm12c	Dodecilaldehído	50	53.1	6.82

Los porcentajes de sustitución empíricos se obtuvieron del microanálisis realizado a los espectros de resonancia magnética nuclear de los diferentes tipos de quitosano. Donde se tomó como referencia la integral de la señal H2 (ver Figura 17) la cual varía en forma proporcional a la cantidad de grupos aminos sustituidos con las cadenas carbonadas. Mientras que la fuerza de disociación pK_a , se calculó utilizando la expresión,

$$pK_a = -\log_{10}(K_a); \text{ en donde } K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}, \quad [7]$$

donde K_a , es la constante de disociación la cual está en función la concentración de las especies química A^- y H^+ ⁶⁰.

4.1.1 Evidencia de la derivatización del Quitosano.

Con la finalidad de determinar la consecución de la derivatización del quitosano, se utilizaron las técnicas de resonancia magnética nuclear de protón (RMN 1H) y espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) para identificar los grupos moleculares característicos del biopolímero y de los diferentes sustituyentes en los productos obtenidos de la reacción química.

4.1.1.1 RMN 1H de los Quitosanos derivatizados.

Los espectros de RMN 1H del quitosano comercial y de los quitosanos sustituidos con aldehídos de 8, 10 y 12 carbonos con sus diferentes grados de sustitución se muestran en la Figura 17, Figura 18, y Figura 19, respectivamente. Y las señales se asignaron de la siguiente manera: la señal de los protones del D_2O presentan un desplazamiento químico característico a 4.7 ppm, mientras que los protones H-1 de la D-glucosamina y N-acetil glucosamina se asignaron a los picos $\delta=4.2$ y 4.5 ppm, respectivamente. Los protones del anillo de piranosa

(H-3, 4, 5, 6') resuenan en el rango de $\delta=3.3-3.5$ ppm⁶¹, mientras que las señales en $\delta=2.6-2.8$ ppm son identificados como los protones residuales H-2 de la D-glucosamina⁶²⁻⁶⁴. Los picos en $\delta\sim 1.6$ ppm son atribuidos al protón (-NH) de la N-acetil glucosamina. Los picos en $\delta=0.4$, 1.0 y 1.3 ppm característicos de la reacción de sustitución e identifican específicamente a los residuos del aldehído (-CH₃, -CH₂, y -CH₂-(C-N)) una vez que se une al grupo amino del quitosano. Las intensidades del pico a 2.8 ppm varían, aumentando en forma proporcional con el porcentaje de sustitución de los quitosanos derivatizados. Para obtener los valores del grado de sustitución empíricos se realizó un micro análisis con los datos obtenidos experimentalmente^{52, 65}. Este micro análisis consistió en determinar la proporción del área bajo la curva del pico observado en el quitosano derivatizado respecto al quitosano comercial. Los resultados de este micro análisis están especificados en la Tabla 1.

4.1.1.2 FT-IR de los Quitosanos derivatizados.

Los espectros de infrarrojo (FT-IR) obtenidos para el quitosano comercial y para los diferentes quitosanos derivatizados se muestran de la Figura 20 a la Figura 22. Los espectros de FT-IR muestran una banda ancha localizada entre 4000 y 2800 cm⁻¹ asociada a las vibraciones de estiramiento de los grupos -NH₂ y -OH⁶⁶. En el espectro del Qm se identifican diferentes bandas de absorción características en la estructura del quitosano: La señal en 1393 cm⁻¹ corresponde al estiramiento asimétrico del enlace N-H de la amina terciaria. Las banda de absorción en 1164 cm⁻¹ corresponde al movimiento de tensión asimétrico del puente C-O-C, y las bandas 1092 y 1042 cm⁻¹ son asociadas a las vibraciones de estiramiento del enlace C-O. Estas últimas señales también son características en la estructura de los sacáridos⁶⁷⁻⁶⁸.

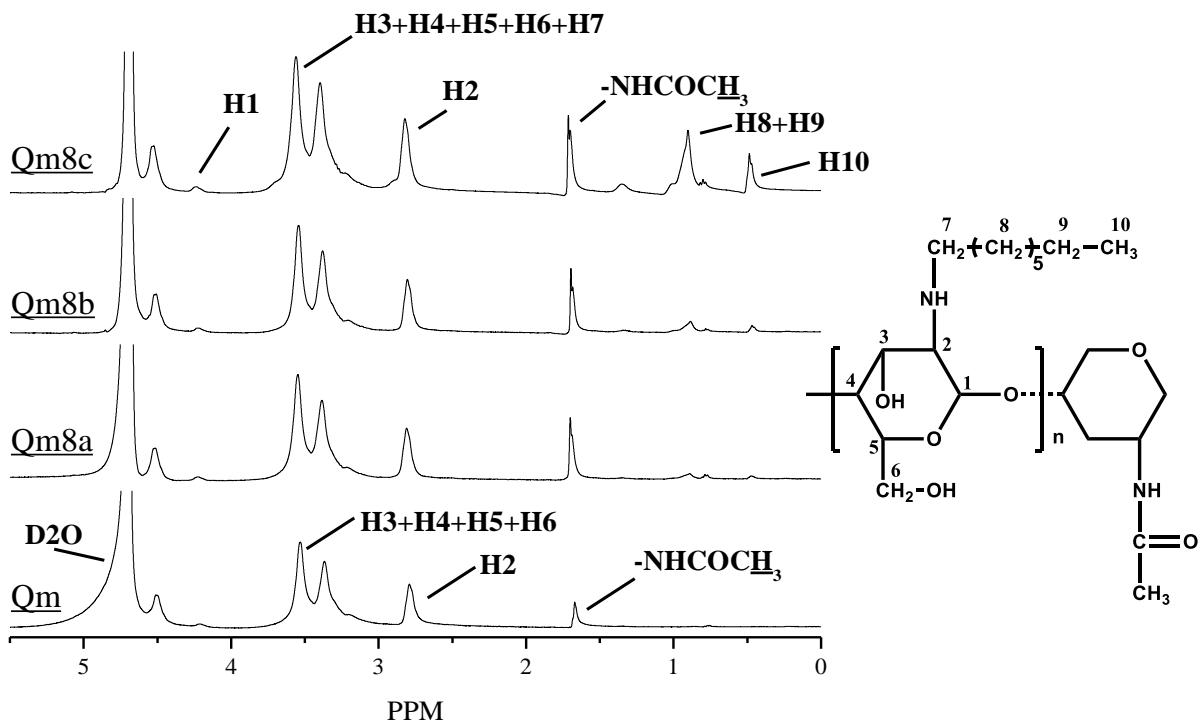


Figura 17.- Espectros de RMN ^1H del quitosano comercial (Qm) y de los quitosanos derivatizados con octilaldehído, en porcentaje de sustitución del 5, 10 y 50 % (Qm8a, Qm8b, Qm8c, respectivamente) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$.

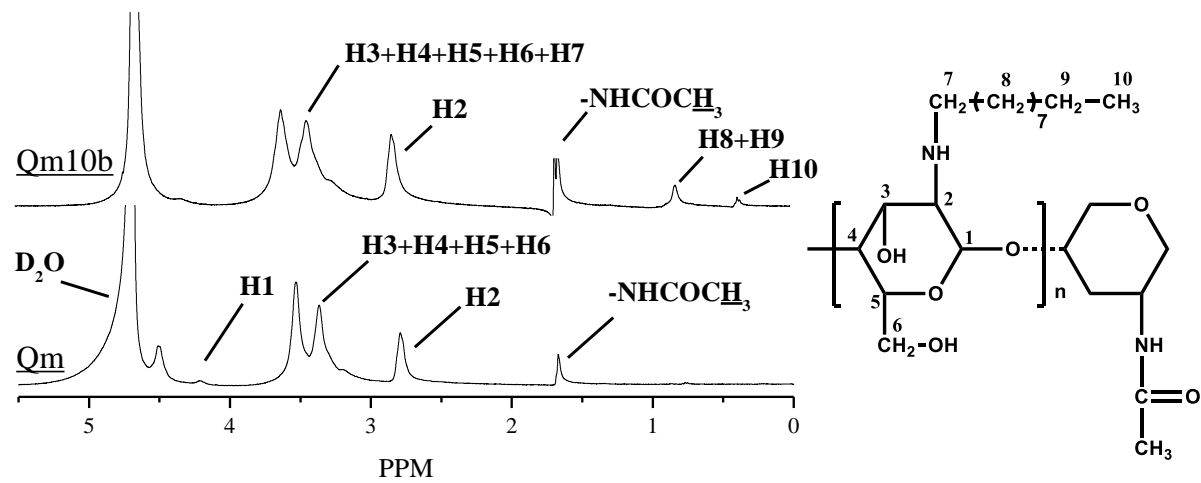


Figura 18.- Espectros de RMN ^1H del Qm y del quitosano derivatizado con decilaldehído, con un porcentaje de sustitución del 10 % (Qm10b) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$.

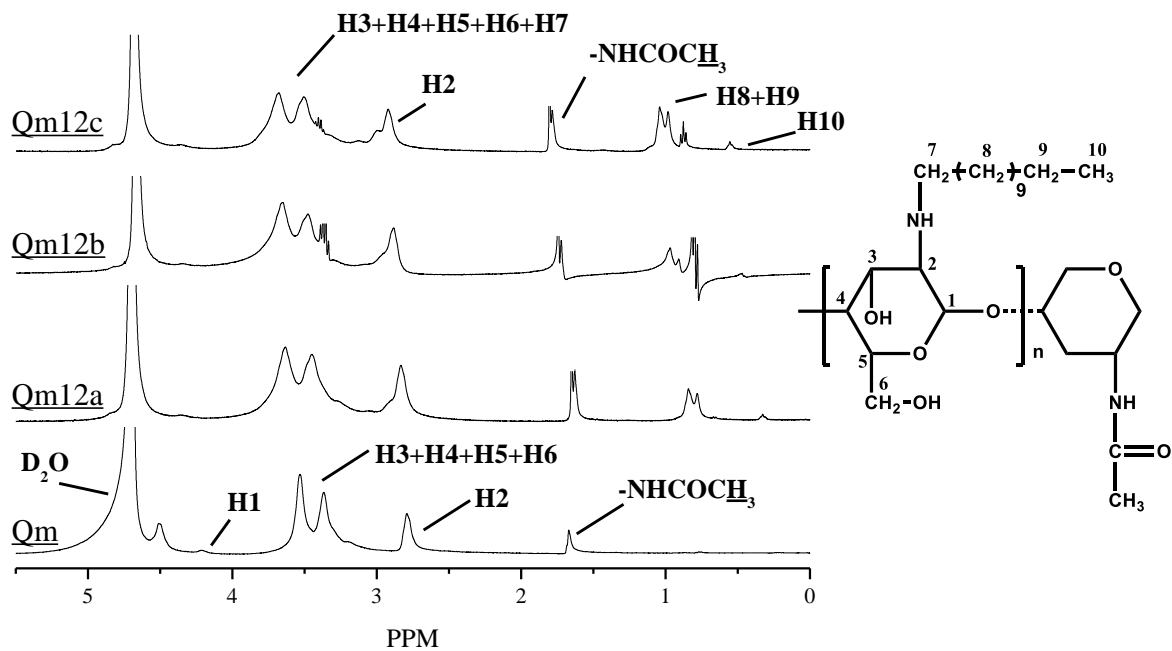


Figura 19.- Espectros de RMN ^1H del Qm y de los quitosanos derivatizados con dodecinaldehído, en porcentaje de sustitución del 5, 10 y 50 % (Qm12a, Qm12b, Qm12c, respectivamente) en $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$.

Tomando como referencia el espectro FT-IR del Qm y comparándolo con los quitosanos derivatizados, observamos la presencia de una señal de flexión en 1640 cm^{-1} del enlace N-H de amina primaria y una absorción débil en 2330 cm^{-1} asociados a las vibraciones del ion amonio. Adicionalmente, el pico en 1605 cm^{-1} se atribuye a la disminución de grupos amino sin reaccionar durante la síntesis. Finalmente, las bandas observadas en los quitosanos derivatizados alrededor de los 2330 y 2170 cm^{-1} corresponden al ion cianuro (-NC) o a las vibraciones del enlace borano (-BH)⁶⁹, ambos residuos de la reacción de derivatización de los quitosanos.

4.1.1.3 Tensiometría de gota.

El estudio de tensiometría de gota en la interfase aire-líquido se realizó a un grupo representativo de los quitosanos derivatizados. En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos de los módulos elásticos (E') y de la viscosidad (E''/ω) en función de la frecuencia en la interfase aire-líquido de suspensiones poliméricas (4 mg/mL) en solución acuosa de quitosano comercial Qm y quitosanos derivatizados con aldehídos de 12 carbonos en proporciones de sustitución del 5, 10 y 50 %. Estas mediciones se realizaron a temperatura ambiente. En la Figura 23 observamos que el comportamiento del módulo elástico y de la viscosidad se ajusta adecuadamente al modelo mecánico simple de Maxwell (ecuación [1] y ecuación [2]). Es de notar que el valor del módulo elástico del quitosano comercial, se encuentra significativamente por debajo de los valores alcanzados por los quitosanos derivatizados. Este comportamiento podría deberse a que la interfase aire-líquido de los quitosanos derivatizados es relativamente más elástica debido a los grupos hidrofóbicos que interactúan activamente con la interfase.

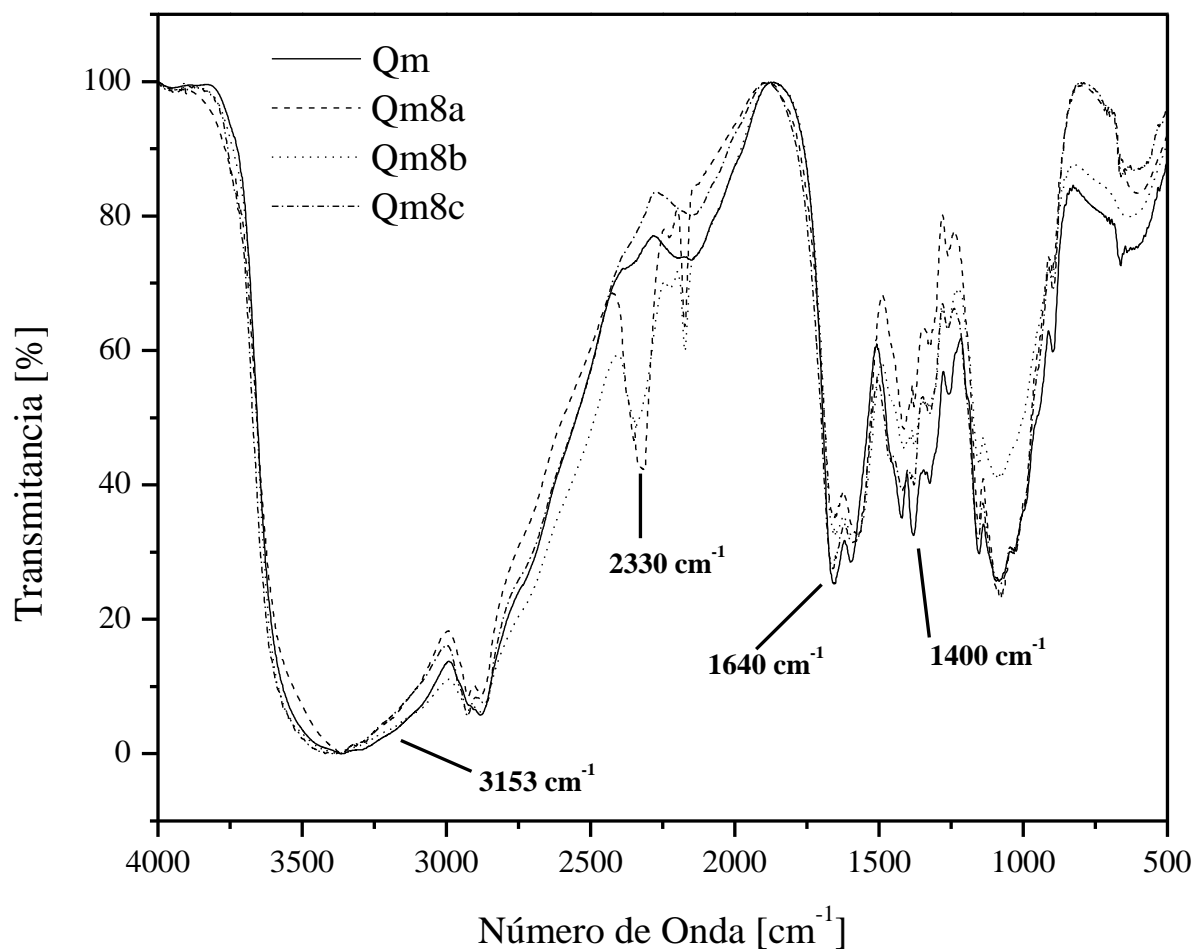


Figura 20.- Espectros de FT-IR del Qm y de los quitosanos derivatizados Qm8a, Qm8b, y Qm8c.

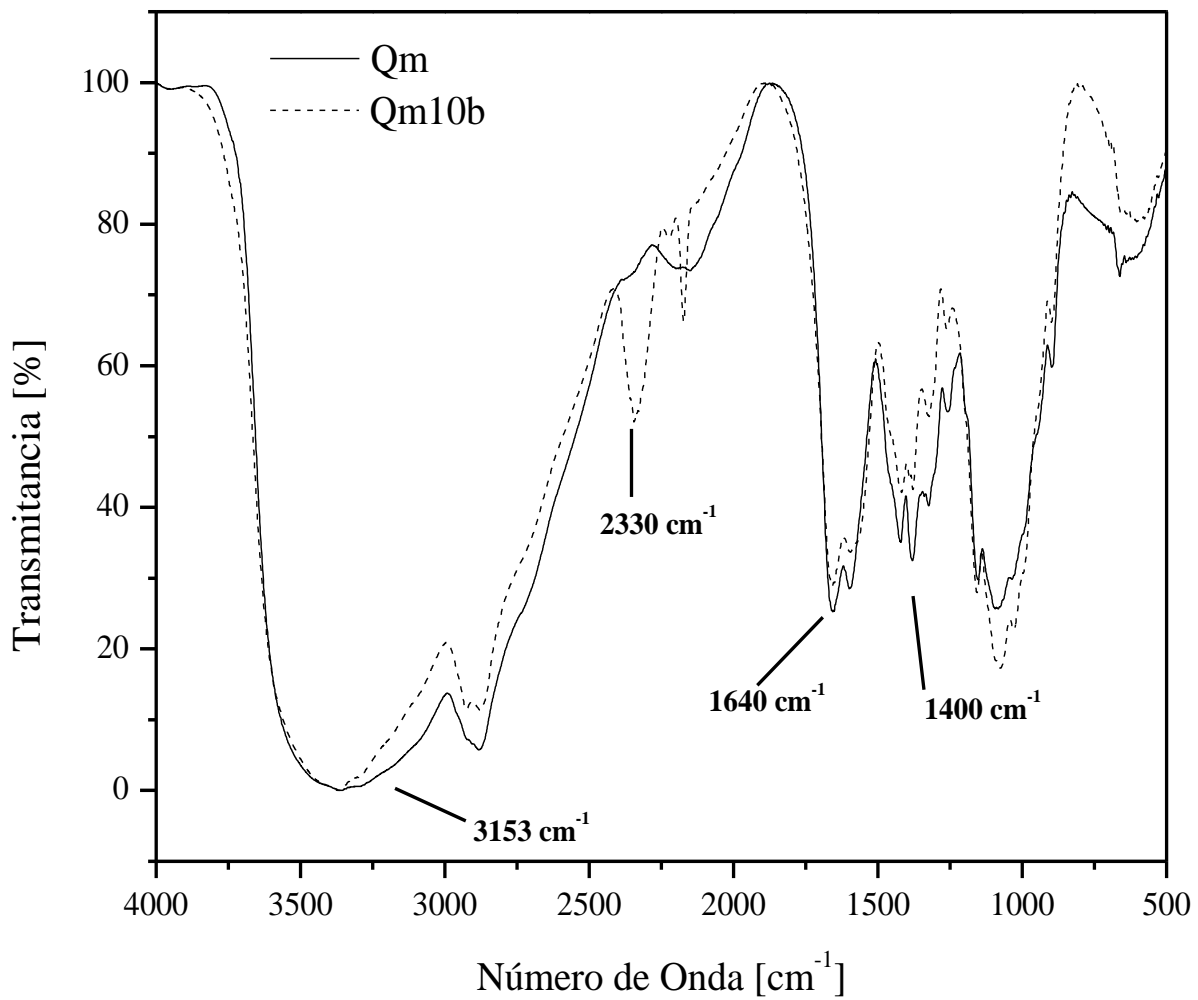


Figura 21.- Espectros de FT-IR del Qm y del quitosano derivatizado Qm10b.

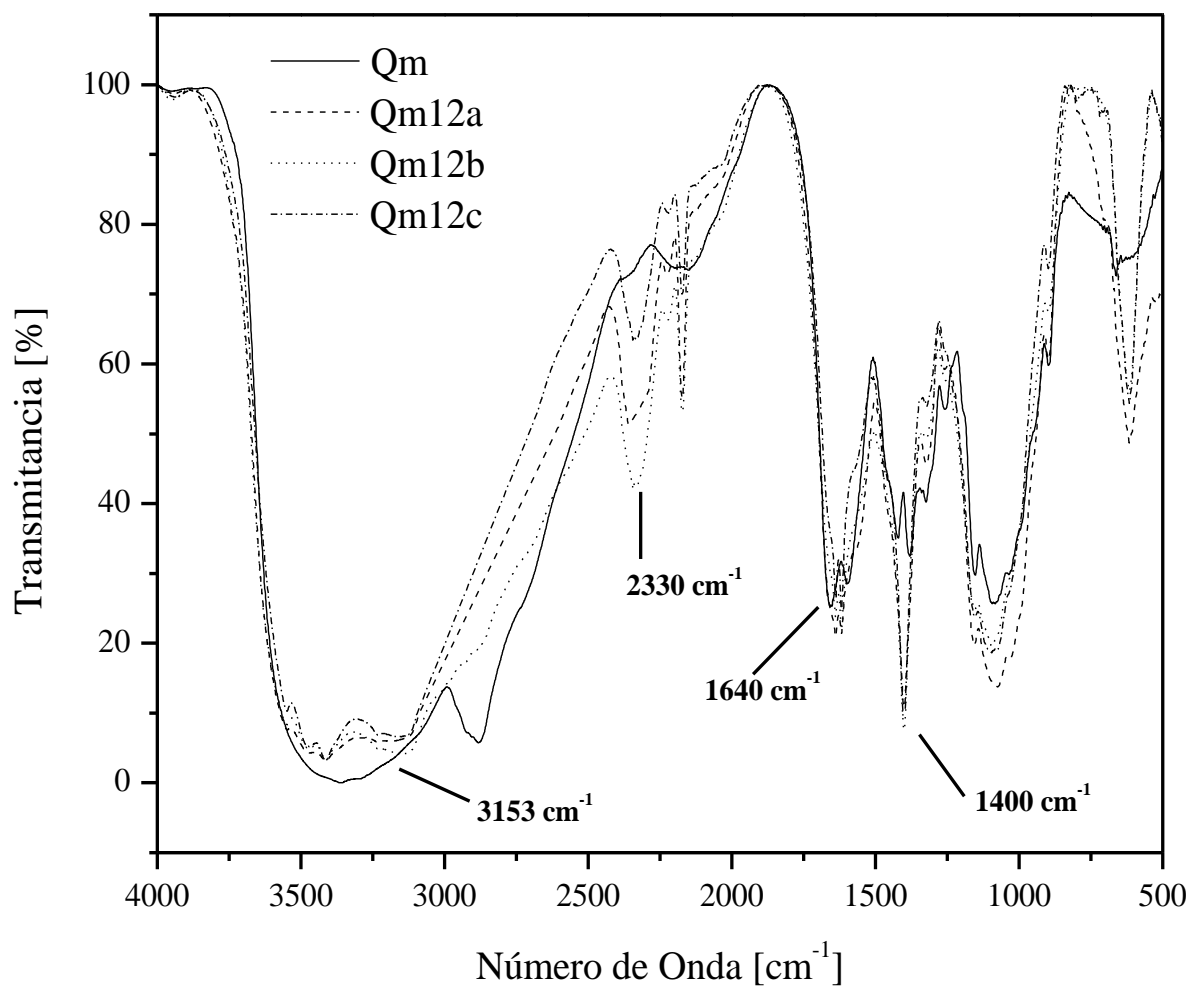


Figura 22.- Espectros de FT-IR del Qm y de los quitosanos derivatizados Qm12a, Qm12b, y Qm12c.

Este efecto queda corroborado al observar que los valores del módulo elástico aumentan a medida que el grado de sustitución aumenta en los quitosanos derivatizados. Por otra parte el comportamiento de la viscosidad extrapolada a frecuencia cero (ver Tabla 2) sigue el comportamiento de Maxwell, mostrando que la viscosidad aumenta a medida que más grupos hidrófobos interactúan en la interfase, haciendo que tenga un comportamiento viscoelástico, característico en polímeros autoasociativos. En términos del tiempo de relajación, λ , observamos que existe un aumento del tiempo característico de relajación a medida el grado de sustitución aumenta. Este efecto es debido a que a la interfase le toma más tiempo volver a su estado de equilibrio por el efecto hidrofóbico adicionado en los quitosanos derivatizados.

Tabla 2.- Ajuste de Maxwell del módulo elásticos, viscoso y de los tiempos de relajación de la interfase aire-líquido de las suspensiones de polímero en solución acuosa del Qm y de los quitosanos derivatizados con dodecildehído, con porcentaje de sustitución del 5, 10 y 50 %.

n.º	Quitosanos	$E_{0+\Delta E}$ [mPa]	$\eta^*_{\omega \rightarrow 0}$ [mPa·s]	λ [s]
1	Qm	26.0 ± 1.0	141.6 ± 12	4.0 ± 0.2
2	Qm12a	70.4 ± 3.0	123.2 ± 6	4.5 ± 0.1
3	Qm12b	88.0 ± 1.0	501 ± 10	7.8 ± 1.0
4	Qm12c	95.8 ± 2.0	913.6 ± 15	8.3 ± 0.5

Estos resultados muestran el efecto hidrofóbico de la derivatización realizada a los diferentes quitosanos, y permiten entender del punto de vista reológico interfacial el aumento de la interacción del quitosano con la interfase aire-líquido. Los grupos hidrofóbicos actúan en

la interfase de manera activa, promoviendo cambios en las propiedades interfaciales, como en las suspensiones acuosas.

4.2 Formación de Nanopartículas de quitosano-insulina.

4.2.1 Evidencia de asociación de las NPQIs.

Para evidenciar la asociación intermolecular entre los diferentes tipos de quitosanos derivatizados y la proteína insulina, se realizaron mediciones de espectroscopia de infrarrojo (FT-IR). Cada espectro mostrado a continuación corresponde a un tipo diferente de quitosano y comparado individualmente con los espectros de las nanopartículas elaboradas con la misma especie del biopolímero complejo con o sin insulina. Para este estudio se utilizó el quitosano comercial (Qm) y únicamente los quitosanos derivatizados con aldehídos de 8, 10 y 12 carbonos con grado de sustitución del 10 %.

4.2.1.1 FT-IR de las NPQIs.

En la Figura 24 se muestra el espectro FT-IR realizado a las nanopartículas hechas con quitosano comercial y en la Figura 25, Figura 26 y Figura 27 los espectros de las NPs hechas con Qm8b, Qm10b y Qm12b, respectivamente. En estos espectros se observaron dos picos característicos en 2933 y 1883 cm^{-1} asociados a los movimientos de vibración de los grupos $-\text{CH}_2$ en el anillo de piranosa. Las dos señales en 1597 y 1650 cm^{-1} corresponden a la amina primaria y al grupo carbonilo de la N-acetil glucosamina, respectivamente. En cuanto a los quitosanos modificados, se observan cambios en la banda situada $\sim 800 \text{ cm}^{-1}$ del enlace N-H debido a la adición de las cadenas carbonadas en el grupo amino del quitosano.

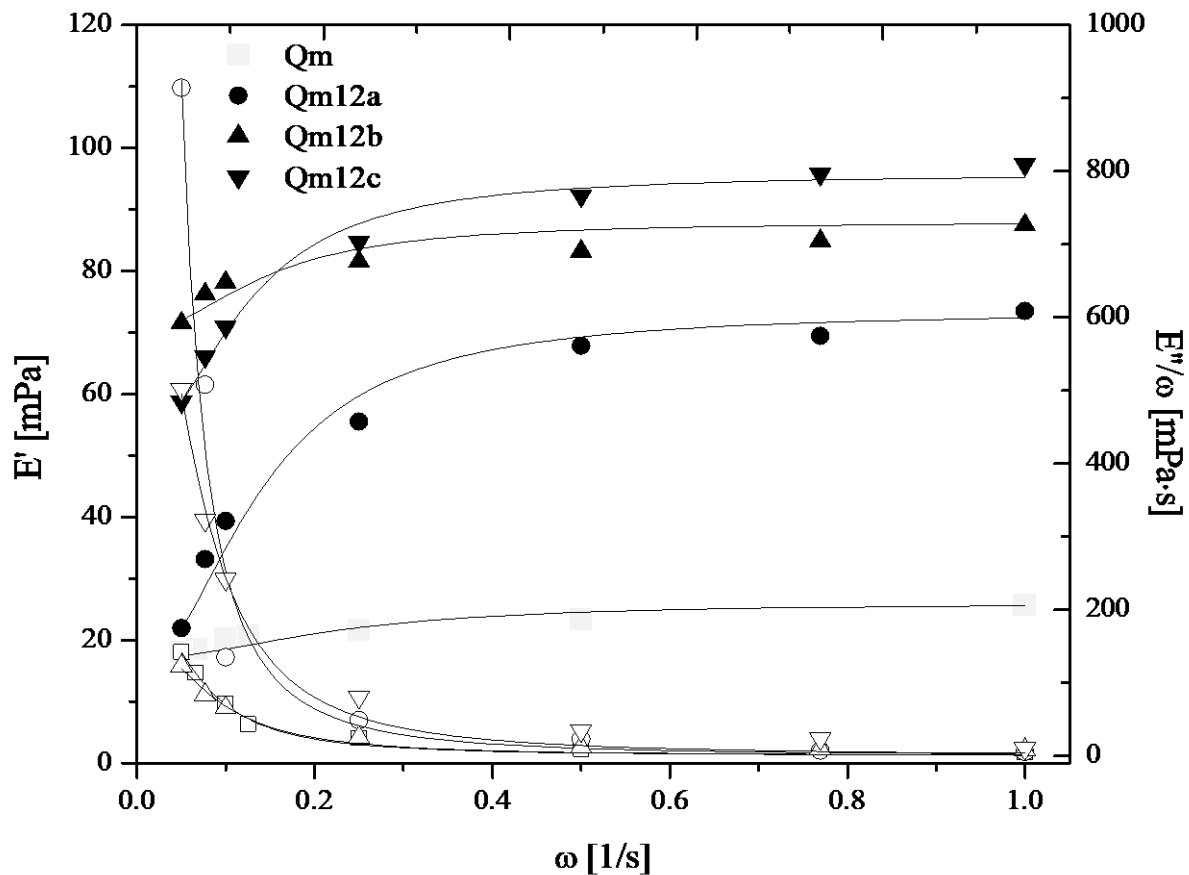


Figura 23.- Módulos elásticos (E') y viscosidad (E''/ω) vs. frecuencia en la interfase aire-líquido de suspensiones poliméricas en solución acuosa de quitosano comercial Qm, y quitosanos derivatizados con aldehído de 12 carbonos en proporciones de sustitución de 5, 10 y 50 %. Estas mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Las líneas representan el ajuste teórico del modelo de Maxwell simple.

Estos cambios son más evidentes a medida que la longitud de la cadena del aldehído aumenta (ver Figura 26 y Figura 27). El pico situado en 3153 cm^{-1} y el hombro en 1557 cm^{-1} corresponden a la señal de la amina secundaria (vibraciones de estiramiento del grupo -NH), lo cual sugiere que la cadena hidrofóbica está enlazada al grupo amino del quitosano (ver de la Figura 25 a la Figura 27). La señal en 1400 cm^{-1} se asigna a las vibraciones (-CH₂) de la cadena alifática. Los espectros de FT-IR de las NPQs y de las NPQIs muestran cambios significativos cuando son comparados con los espectros del Qm y de los quitosanos modificados hidrofóticamente. En el caso de la banda localizada entre los 4000 y 2800 cm^{-1} es más amplia para las NPQs y NPQIs respecto a la banda mostrada por el Qm y los quitosanos derivatizados, lo que sugiere que la adición del TTP forma nuevos enlaces de hidrógeno en las nanopartículas⁷⁰. La aparición del TPP se aprecia en los dos hombros ubicados en 2500 cm^{-1} y en el pico del enlace P=O a 1150 cm^{-1} ⁷¹. Además, puede observarse que el pico en 1594 cm^{-1} desaparece y un nuevo pico aparece en 1556 cm^{-1} en los espectros de las NPQs y NPQIs. Este efecto se atribuye a la unión entre el ion fosfórico y el ion amonio⁷⁰.

Por otra parte, la asociación de la insulina en las NPQIs es corroborada por la identificación de bandas típicas de proteínas como la flexión -NH de la amina primaria (1700 - 1600 cm^{-1}) y de la amina secundaria (1580 - 1480 cm^{-1}). También por la señal de estiramiento del enlace C-N de la amina terciaria en 1230 cm^{-1} ⁷².

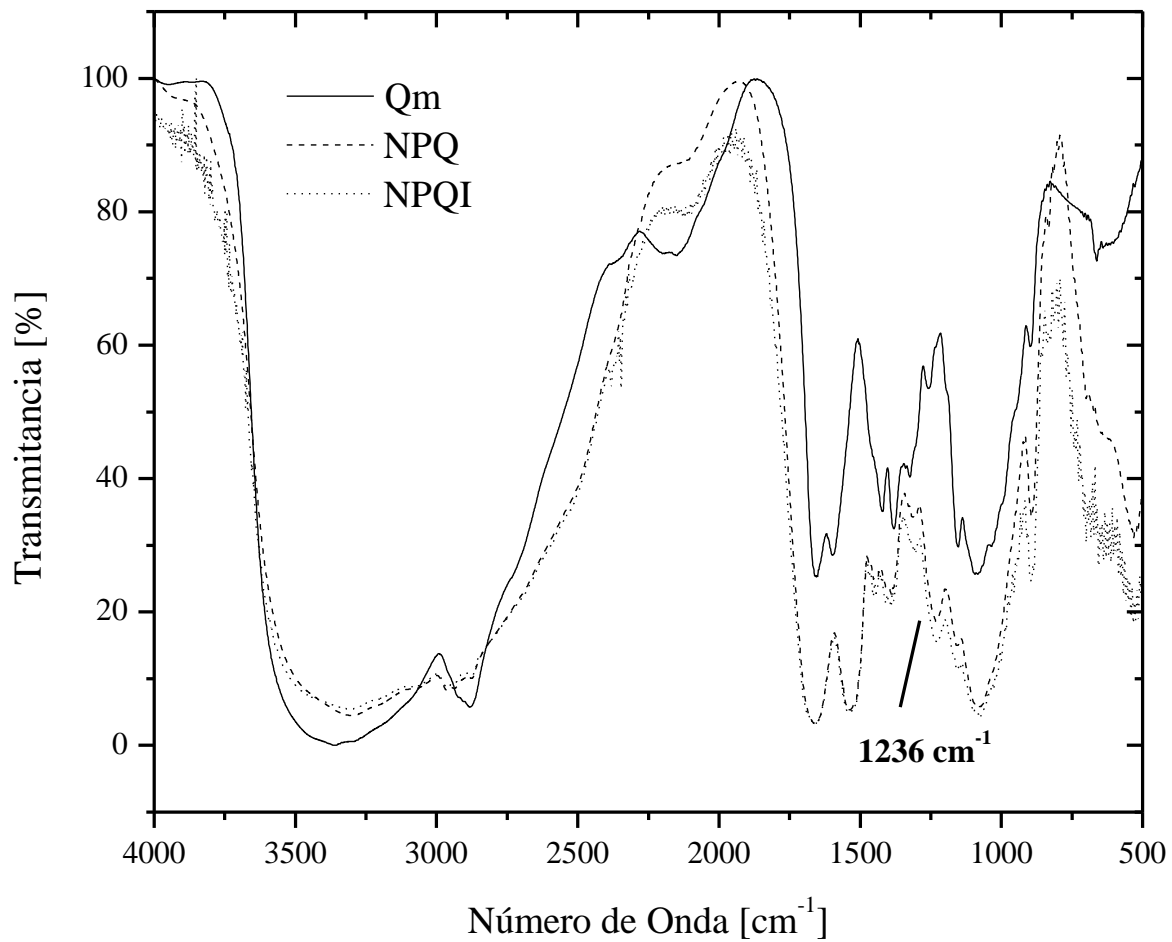


Figura 24.- Espectro de FT-IR del Qm y de nanopartículas hechas con Qm con y sin insulina (NPQI y NPQ, respectivamente).

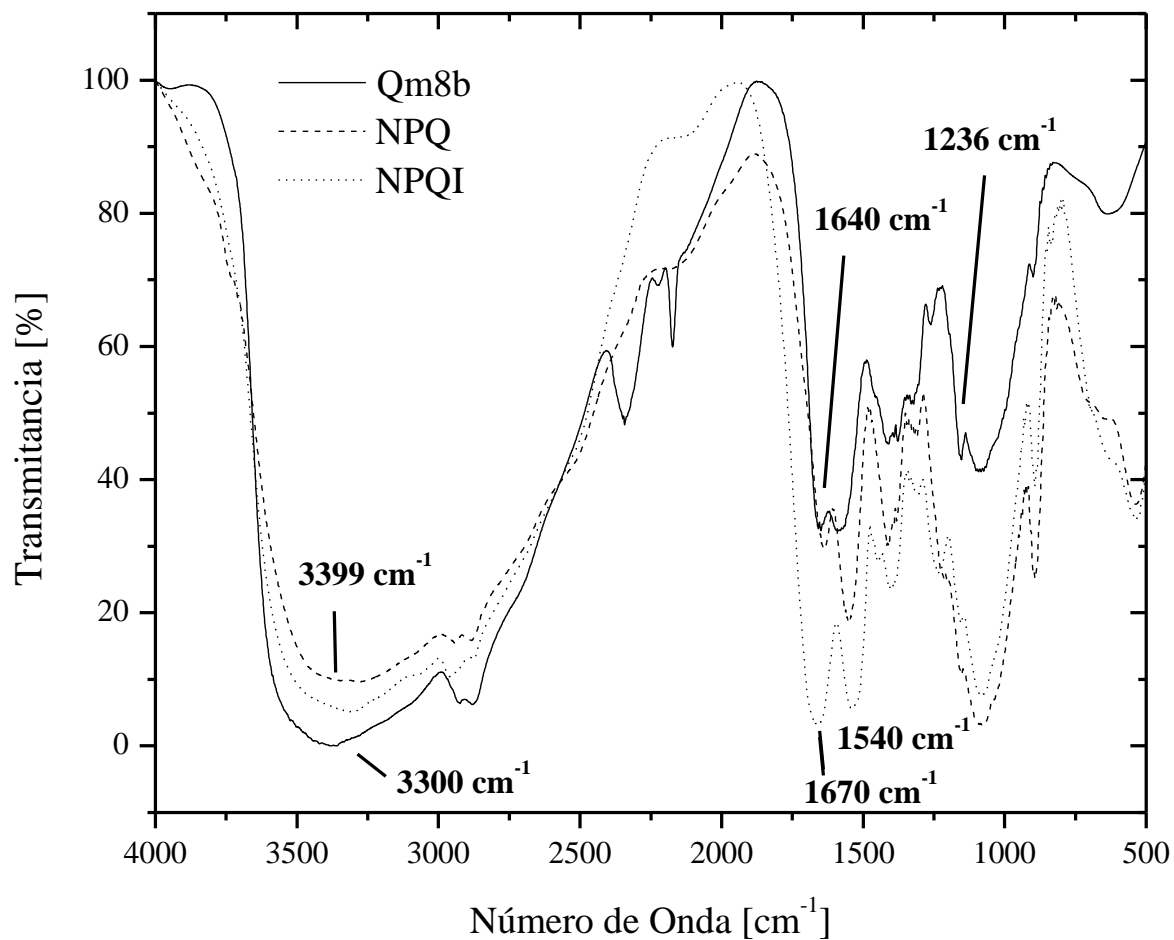


Figura 25.- Espectro de FT-IR del quitosano derivatizado Qm8b y de nanopartículas hechas con Qm8b con y sin insulina (NPQI y NPQ, respectivamente).

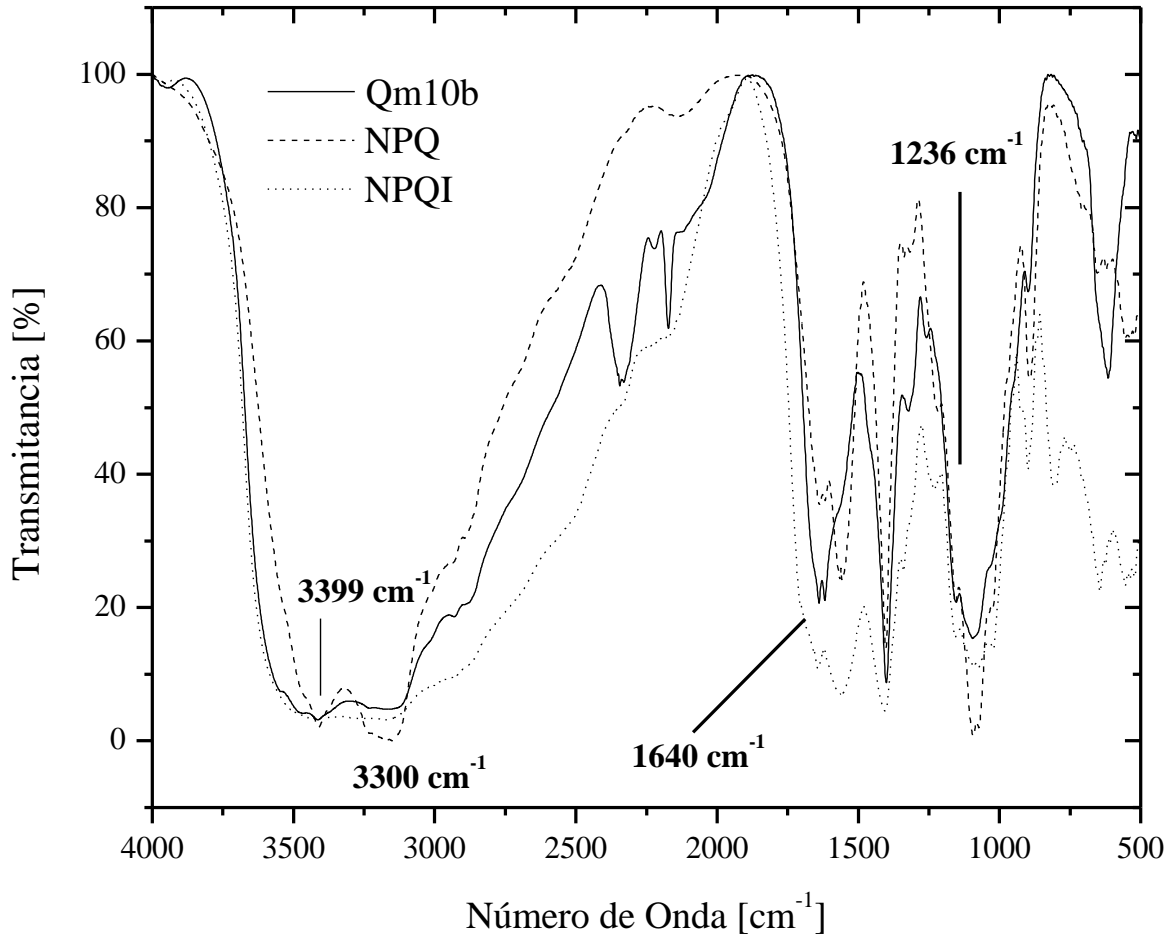


Figura 26.- Espectro de FT-IR del quitosano derivatizado Qm10b, y de nanopartículas hechas con Qm10b con y sin insulina (NPQI y NPQ, respectivamente).

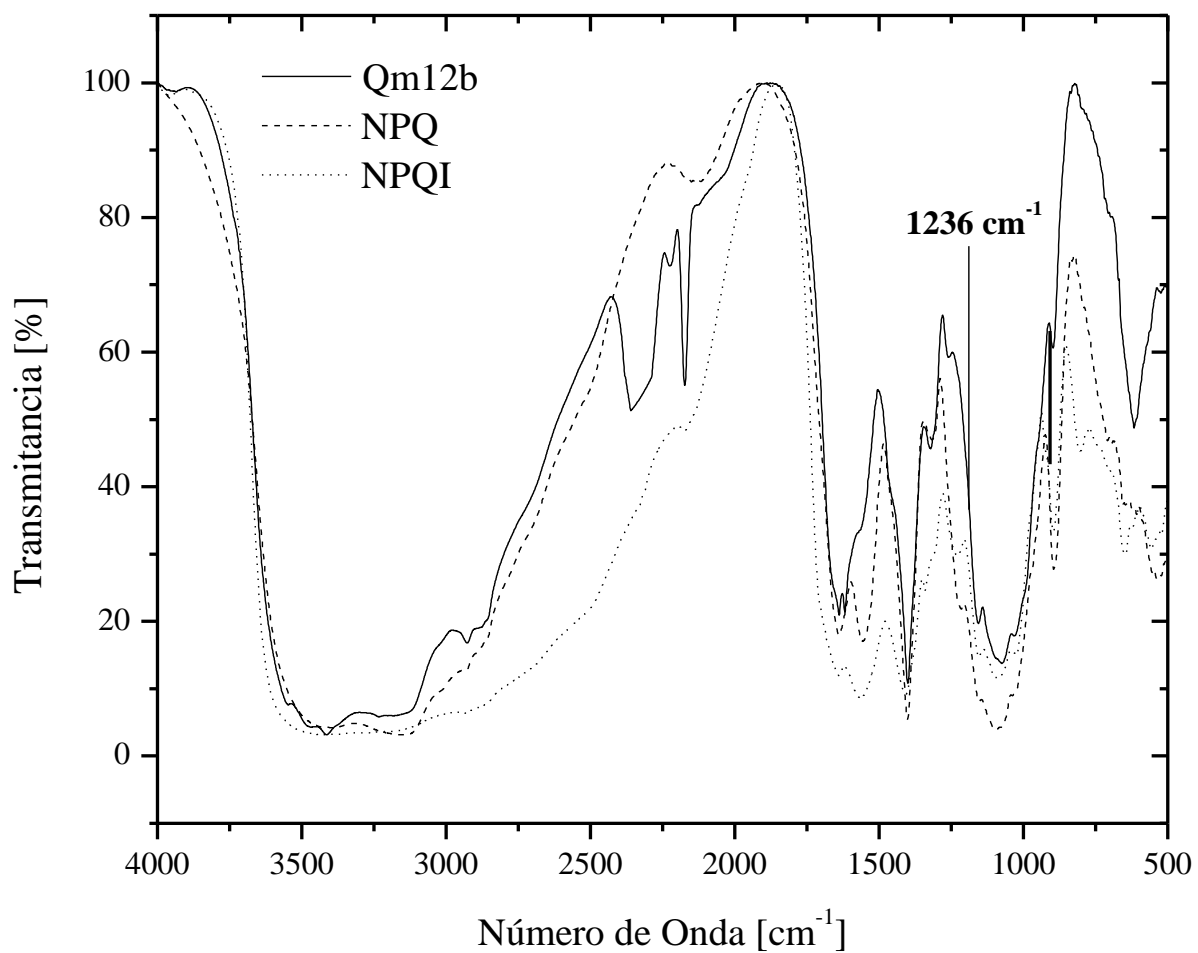


Figura 27.- Espectro de FT-IR del quitosano derivatizado Qm12b, y de nanopartículas hechas con Qm12b con y sin insulina (NPQI y NPQ, respectivamente).

4.3 Caracterización física de las nanopartículas.

Las suspensiones coloidales de las nanopartículas de quitosano (NPQ) y de las nanopartículas de quitosano con insulina (NPQI) se analizaron con la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) con la finalidad de estimar el efecto de las diferentes condiciones en la síntesis de las nanopartículas sobre los radios hidrodinámicos R_H de los coloides. Estos experimentos se complementaron con las mediciones de potencial zeta (PZ) para determinar la carga superficial de las NPs y estimar la estabilidad de las suspensiones. Adicionalmente se utilizaron las técnicas de microscopía de fuerza atómica (AFM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM) para observar los perfiles de tamaños y formas de las NPs y comprender la estructuración de las NPs por efecto de la modificación química de los diferentes quitosanos derivatizados.

4.3.1 Dispersión Dinámica de Luz (DLS).

En la Tabla 3, están resumidos los valores de R_H de las nanopartículas de quitosano con y sin insulina realizadas a un pH 5.3 a temperatura ambiente. En la Tabla 3, se observa que las NPQs presentan un tamaño menor respecto a las NPQIs. También se aprecia que tanto las NPQs como las NPQIs obtenidas con quitosanos hidrofólicamente modificados tienen menor tamaño que las NPs formadas con Qm, independientemente de la longitud y el grado de sustitución del aldehído en la cadena polimérica. Este resultado sugiere que la influencia de las cadenas alifáticas (hidrofólicas) desempeña una función importante en la estructura, forma y tamaño de las NPs. Esta influencia también se aprecia en el aumento del tamaño de las NPQs a medida que la longitud de la cadena del sustituyente crece manteniendo el grado de sustitución

constante. Mientras que el tamaño de las NPQs decrece al aumentar el grado de sustitución. Este efecto resulta de la compactación del núcleo de las NPs, forzada por los grupos hidrófobos en un intento de evitar la exposición con el solvente ⁴. En contraste, al incorporar la insulina a la formulación se observa un incremento en el tamaño de las nanopartículas (NPQIs) respecto a las NPQs. Esto puede deberse, tanto a la incorporación de la proteína a la nanopartícula como a una posible disminución en la efectividad de entrecruzamiento al competir iónicamente el TPP y la insulina en los sitios del quitosano, provocando una expansión en las NPQIs.

Tabla 3.- Diámetro promedio medido por dispersión dinámica de luz (DLS) y potencial zeta (PZ) de nanopartículas de quitosanos (NPQs) y nanopartículas de quitosano con insulina (NPQIs) a un pH 5.3 a 25 °C.

N.º	Quitosanos Derivatizados	NPQs Diámetro Promedio [nm]	NPQs Potencial Zeta [mV]	NPQIs Diámetro Promedio [nm]	NPQIs Potencial Zeta [mV]
1	Qm	360 ± 60	8 ± 3	500 ± 70	7 ± 3
2	Qm8a	260 ± 15	18 ± 3	280 ± 20	20 ± 4
3	Qm8b	120 ± 40	27 ± 4	430 ± 30	32 ± 4
4	Qm8c	140 ± 26	19 ± 3	236 ± 40	28 ± 4
5	Qm10b	200 ± 30	24 ± 4	240 ± 30	32 ± 4
6	Qm12a	310 ± 20	24 ± 3	360 ± 30	31 ± 4
7	Qm12b	300 ± 35	28 ± 3	400 ± 50	27 ± 4
8	Qm12c	250 ± 30	22 ± 4	300 ± 35	29 ± 4

También se aprecia que las condiciones del pH inicial en las soluciones de quitosano y TPP/insulina, influían en el tamaño promedio de las NPs. Por esta razón se eligió la formulación descrita en la sección experimental, al obtener con ella las nanopartículas de

menor diámetro respecto a otras formulaciones probadas durante la investigación. La información de las especificaciones de la formulación alternativa están descritos en el Anexo 1 junto con los valores de diámetros de las NPs obtenidas con este método.

El tamaño de la partícula es determinante en la absorción en el tejido epitelial y mucoso y en el tránsito intercelular de la nanopartícula⁷³. Desde el punto de vista funcional la modulación en el tamaño de las NPs formadas con quitosanos hidrofobizados químicamente, puede significar una ventaja en la administración de fármacos. Por ejemplo, las partículas con un tamaño alrededor de 100-300 nm mostraron tener una absorción arterial tres veces mayor en comparación con nanopartículas de un tamaño mayor (~1 μm), debido a que las NPs de menor tamaño eran capaces de penetrar las capas sub-mucosas mientras que las NPs de mayor tamaño predominaron en el revestimiento epitelial⁷⁴. También se aprecia que las condiciones del pH inicial en las soluciones de quitosano y TPP/insulina, influían en el tamaño promedio de las NPs. Se decidió tomar una formulación específica para la continuación del desarrollo experimental (ver Anexo 1).

4.3.2 Potencial Zeta (PZ).

Los resultados de las mediciones de potencial zeta realizadas a las NPQs y NPQIs también están resumidos en la Tabla 3. En estos resultados se observan diferencias significativas por efecto de la hidrofobización de la cadena polimérica del quitosano. En todos los casos, el PZ de las NPQs y NPQIs son relativamente altos y positivos, concordando con la estabilidad observada en la suspensión de las NPs⁷⁵. La carga positiva en la superficie de la partícula es deseable pues permite interactuar con el tejido epitelial mucoso que está

negativamente cargado, logrando aumentar el tiempo de residencia de la NP con el fármaco en el sitio de absorción.

El potencial zeta de las NPs formadas con los quitosanos derivatizados es mayor en comparación con las NPs formadas con el Qm. Se cree que el carácter neutro e hidrófobo de las cadenas laterales adicionadas, se organizan preferencialmente hacia el interior de las NPQIs. Provocando una mayor exposición de los sitios catiónicos del grupo amino del quitosano, explicando el incremento en los valores de potencial zeta. La inclusión de la proteína insulina en las NPs produce un ligero aumento en los valores de PZ respecto a las NPQs. Sería de esperarse que el atrapamiento o adsorción de la proteína en la superficie de la NP redujera significativamente las cargas positivas del quitosano. Sin embargo, este ligero aumento en el PZ se explica en términos de la formulación empleada en la síntesis de las NPs, donde a pH 5.3 se da una asociación débil y poco uniforme de la proteína con las cadenas del quitosano. Este efecto se debe al carácter catiónico que adquiere la proteína zwitteriónica (pI~5.4) en estas condiciones, como se ha observado en trabajos previos⁷⁶⁻⁷⁷. Se sabe que grupos carboxilos en la superficie de la proteína pueden formar puentes de hidrógeno con los grupos amino en ciertos sitios de las cadenas de quitosano, manteniendo una estructuración espacial sin deformarse. Así, el núcleo hidrofóbico (formado por las cadenas laterales de las moléculas de quitosano derivatizado) se mantiene estable, permitiendo que una proporción alta de grupos aminos queden libre. Esta hipótesis tiene sustento al observar las NPs con los valores más alto de PZ y con mayor capacidad de adsorción de la proteína. A diferencia de lo anterior, las NPQIs formadas con quitosano sin modificar (Qm), presentaron una reducción de la carga superficial (comparado con los quitosanos hidrofobizados) semejante a los resultados

obtenidos por López *et al.*⁷⁸. Sin embargo, en contraste con nuestras observaciones, estos autores reportan que la adición de la insulina produce NPQIs con menor carga positiva, implicando que la interacción sea esencialmente electrostática⁷⁹⁻⁸⁰.

Cabe mencionar que se eligió la formulación a pH de 5.3 en la síntesis de las NPs debido a que las NPQIs formadas con quitosanos derivatizados con grado de sustitución del 10 % presentaron una mejor correlación entre los valores más positivos de PZ, como una mayor eficiencia de asociación y de carga de la proteína en las NPs complejadas.

4.3.3 Imágenes de TEM y AFM de las NPs insulina-quitosano.

Se obtuvieron imágenes por TEM y AFM de las NPQs y NPQIs de los diferentes tipos de quitosanos. El tamaño promedio de las NPs observadas en estas imágenes concuerda con los resultados obtenidos por DLS. También puede observarse que la forma de las NPs depende de la hidrofobicidad del quitosano. Por ejemplo, las NPs realizadas con el quitosano sin modificar (Qm) o de bajo grado de sustitución, presentan formas semiesféricas (ver Figura 28) respecto a las NPs formadas con quitosanos con mayor grado de sustitución (ver Figura 29), las cuales muestran una forma elipsoidal.

Las imágenes obtenidas por AFM de las NPs también confirman los resultados observados por la técnica de TEM y DLS. Las NPQs realizadas con quitosano sin modificar (Qm) muestran formas semiesféricas (ver Figura 30 (a)). En la Figura 30(b) se muestra el perfil de altura de las dos NPs observadas en la Figura 30 (a). Cabe señalar, que el perfil de altura es pequeño respecto al diámetro de las NPs, posiblemente porque estas se encuentran comprimidas, o adheridas al sustrato o mica, debido a la deshidratación de la nanopartícula y a la interacción electrostática entre la NP y la superficie del sustrato utilizado. En la Figura 31

(a) y Figura 31 (b), se observa que las NPQs realizadas con las muestras Qm8b y Qm12b presentan un ligero alargamiento, como previamente se observó por TEM. Finalmente, cuando la insulina es complejada a la NP, este presenta una forma alargada y con aspecto rugoso o filamentoso (ver Figura 31 (c)), lo que podría elucidar el incremento de tamaño observado en las mediciones de TEM y DLS.

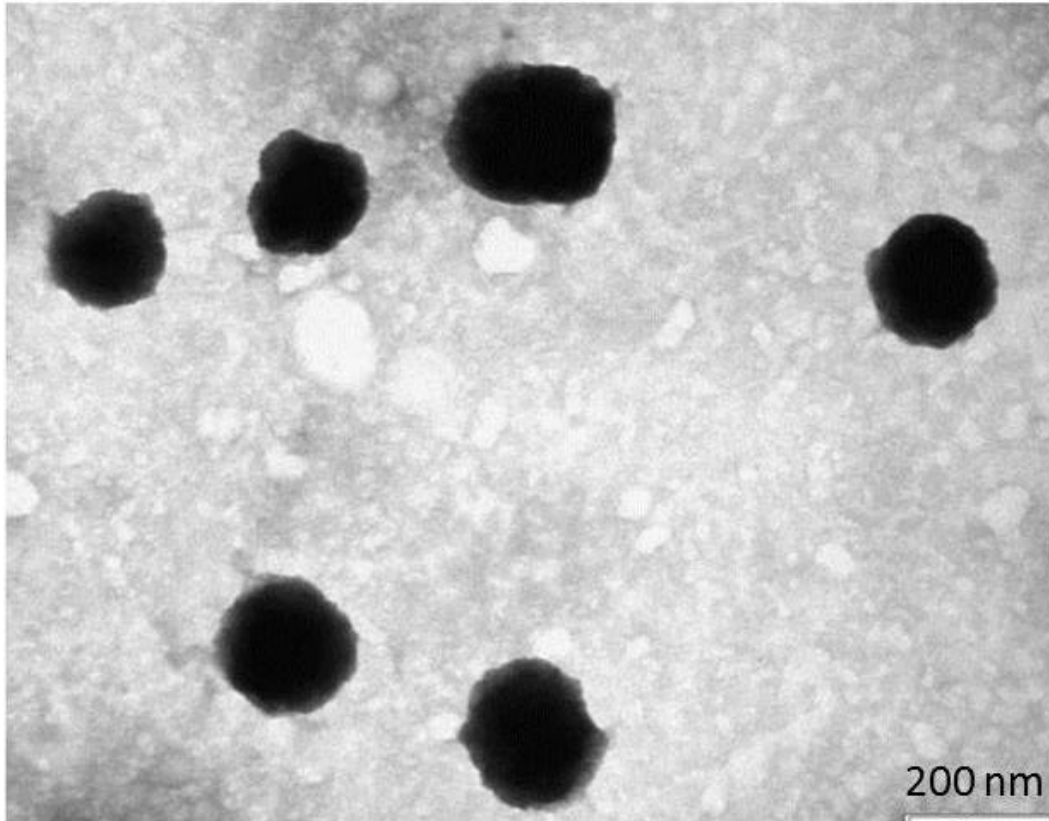


Figura 28.- Imagen obtenida por TEM de las NPQIs realizadas con quitosano derivatizado con octilaldehído con grado de sustitución del 5 % (Qm8a).

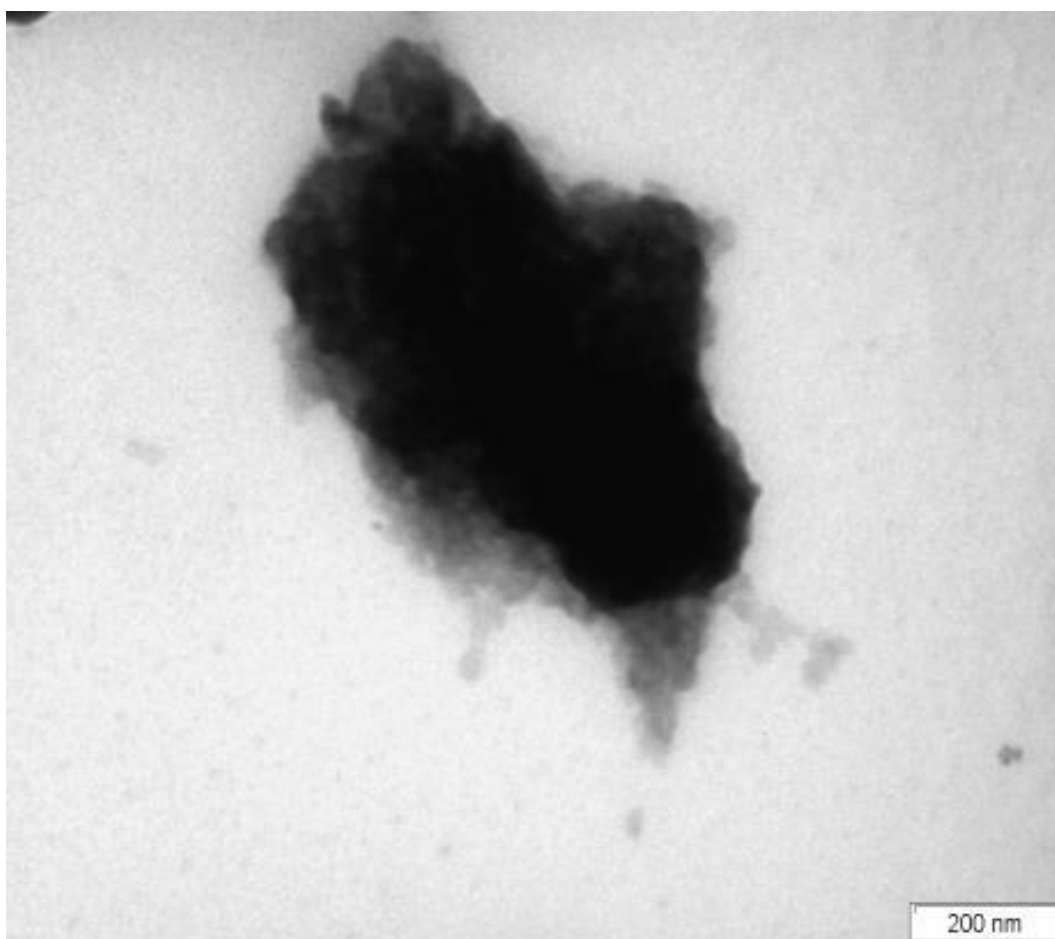


Figura 29.- Imagen obtenida por TEM de las NPQIs realizadas con quitosano derivatizado con dodecilaldehído al 10 % sustitución (Qm12b).

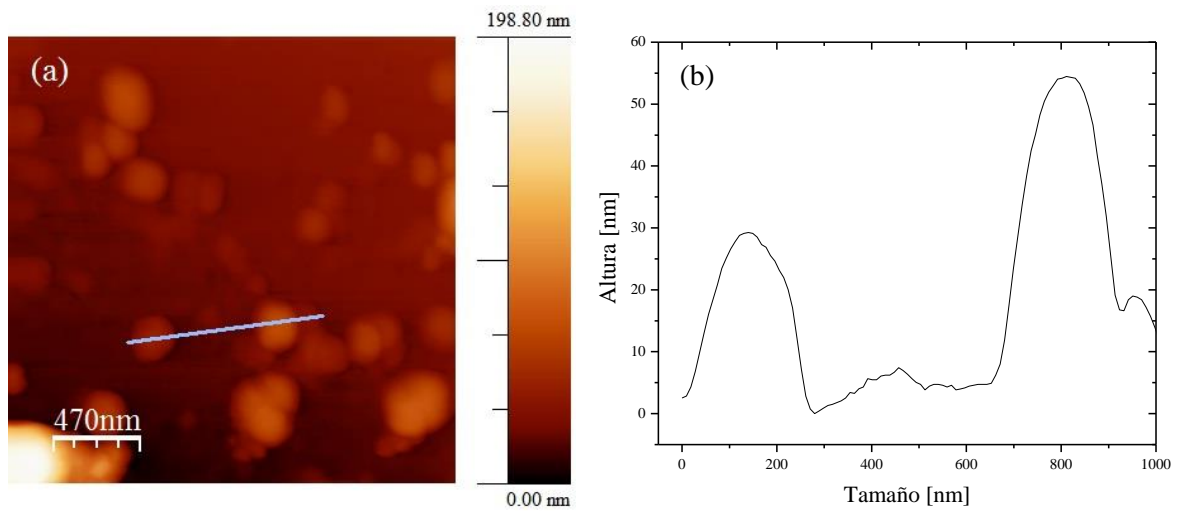


Figura 30.- Imágenes de AFM: (a) NPQs elaboradas con quitosano sin modificar (Qm), (b) perfil de alturas de las NPs mostradas en la imagen.

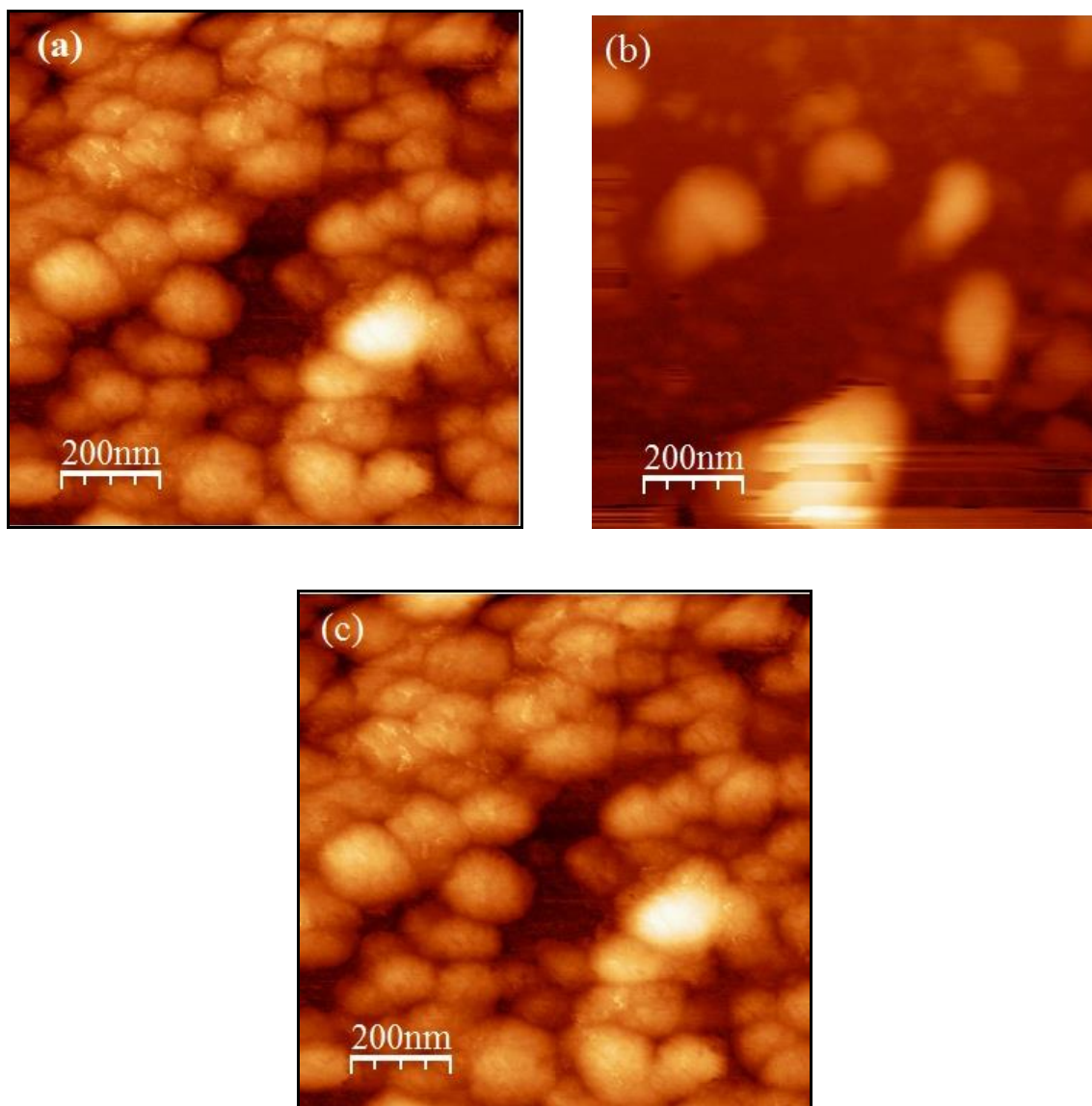


Figura 31.- Imágenes de AFM: (a) NPQs elaboradas con el quitosano derivatizado Qm8b, (b) NPQs elaboradas con el quitosano derivatizado Qm12b, (c) corresponde a las NPQIs realizadas con Qm12b.

4.4 Estudio Termodinámico.

4.4.1 Energía de formación de las NPs Quitosano-Insulina.

La capacidad de un sistema de liberación de fármacos de liberar la carga en el tejido u órgano humano en tratamiento, está fuertemente ligado a la afinidad de asociación entre el fármaco y el vehículo en cuestión. Una forma de estudiar estas interacciones es medir mediante la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) el calor de asociación del vehículo con el fármaco en el proceso de formación de las NPs y con la implementación de un modelo teórico de estas propiedades y calcular la termodinámica de asociación. A fin de determinar el calor de asociación en la interacción insulina-quitosano en presencia del TPP, se desarrollaron dos tipos de experimentos: (1) Se empleó como medición de referencia la titulación de la solución de TPP sin proteína, en la celda de medición conteniendo la disolución del polielectrolito quitosano (cargado positivamente); (2) se realizó una titulación de la solución de TPP con la proteína insulina (cargada negativamente), en la celda de medición conteniendo la disolución de quitosano. Los resultados mostrados a continuación se les han sustraído el valor del calor de interacción obtenido en las mediciones de referencia. Así, las contribuciones de las interacciones termodinámicas de la dilución de insulina y del TPP-quitosano fueron descartadas.

El desarrollo de estos experimentos nos permite evaluar la manera en que el grado de sustitución en la derivatización del quitosano afecta energéticamente a la asociación de las NPQIs. De la Figura 32 a la Figura 34 mostramos los resultados del calor molar de interacción, Q^* , en función de la relaciones molares insulina-quitosano en la formación de

NPs realizadas con Qm y los diferentes quitosanos derivatizados (pH 5.3 en la solución final). Por último, las mediciones han sido normalizadas respecto a la concentración de insulina adicionada en cada inyección.

Las líneas continuas representan los ajustes teóricos realizados a los datos experimentales (ecuación [3]). En la Figura 32 puede observarse que la unión de la insulina con el quitosano, en presencia del TPP, está caracterizada por dos estados bien definidos en todas las mediciones. La primera etapa se registra con un incremento gradual en el calor liberado hasta un mínimo localizado (proceso exotérmico). En la segunda etapa se origina en inyecciones posteriores al mínimo localizado con un proceso endotérmico, sin llegar a alcanzar el equilibrio termodinámico. Analizando todo el proceso de formación de las NPs, observamos que el aumento del calor liberado en las inyecciones iniciales, obedece a la presencia de fuertes interacciones electrostáticas en la acomplejación insulina-quitosano. Es decir, a baja relación molar insulina/quitosano se espera que esta interacción domine el ambiente de formación de las NPs. Como era de esperar, tal efecto se acentúa (mayor variación de calor liberado) en el caso de las NPs formadas con Qm con mayor número de grupos amino disponibles (no hidrofobizado). Mientras, los quitosanos Qm8a y Qm8b muestran un cambio de calor exotérmico menor respecto al comportamiento mostrado con las NPs de Qm, después de las primeras inyecciones de insulina. Este comportamiento, nos lleva a pensar a que la baja hidrofobización (5 y 10 % de sustitución) provoca un aumento en la exposición superficial de las cargas residuales del solvente, favoreciendo a la interacción electrostática con la proteína. Esta idea es apoyada por la disminución del valor estequiométrico n , comparado con las NPs formadas con Qm. Mientras que, para las NPs formadas con Qm8c,

el polímero con mayor grado de sustitución (50 %), muestra una complejación progresiva con la insulina cargada negativamente, al combinar la interacción electrostática con los grupos amino y el efecto hidrofóbico con las cadenas alifáticas adicionadas al quitosano. Esta idea es apoyada por el aumento de n , la disminución ΔH respecto a las NPs formadas con Qm, y los quitosanos derivatizados (Qm8a, Qm8b), asumiendo que el efecto hidrofóbico sea un proceso endotérmico débil⁸¹.

Por otra parte, la tendencia generalizada en todas las gráficas, de aumentar el proceso endotérmico a medida que la relación molar insulina/quitosano crece, revela un cambio a nivel estructural en el sistema, relacionado con el efecto de la gelificación ionotrópica⁸²⁻⁸³. A nivel molecular, la formación de nanopartículas entre polielectrolitos, incluyendo en esta definición a las proteínas cargadas y polisacáridos, pueden causar cambios estructurales a cualquier o a todos los componentes que forma la nanopartícula⁸⁴. Estos cambios estructurales, se relacionan con la concentración de los agregados en las NPs, produce comportamientos endotérmicos muy marcados debido a la deslocalización de las moléculas del disolvente circundante al agregado en formación y de la liberación del ion residual a lo largo de la cadena del polielectrolito (cargas no neutralizadas durante la primera fase de asociación), estos efectos ocurren a medida que la conformación del polielectrolito va cambiando⁸⁵⁻⁸⁶. Consecuentemente, el comienzo de la segunda etapa de asociación, muestra valores endotérmicos relativamente altos, relacionado a la transición de formación de la nanopartícula, como se ha sugerido previamente^{83 87}.

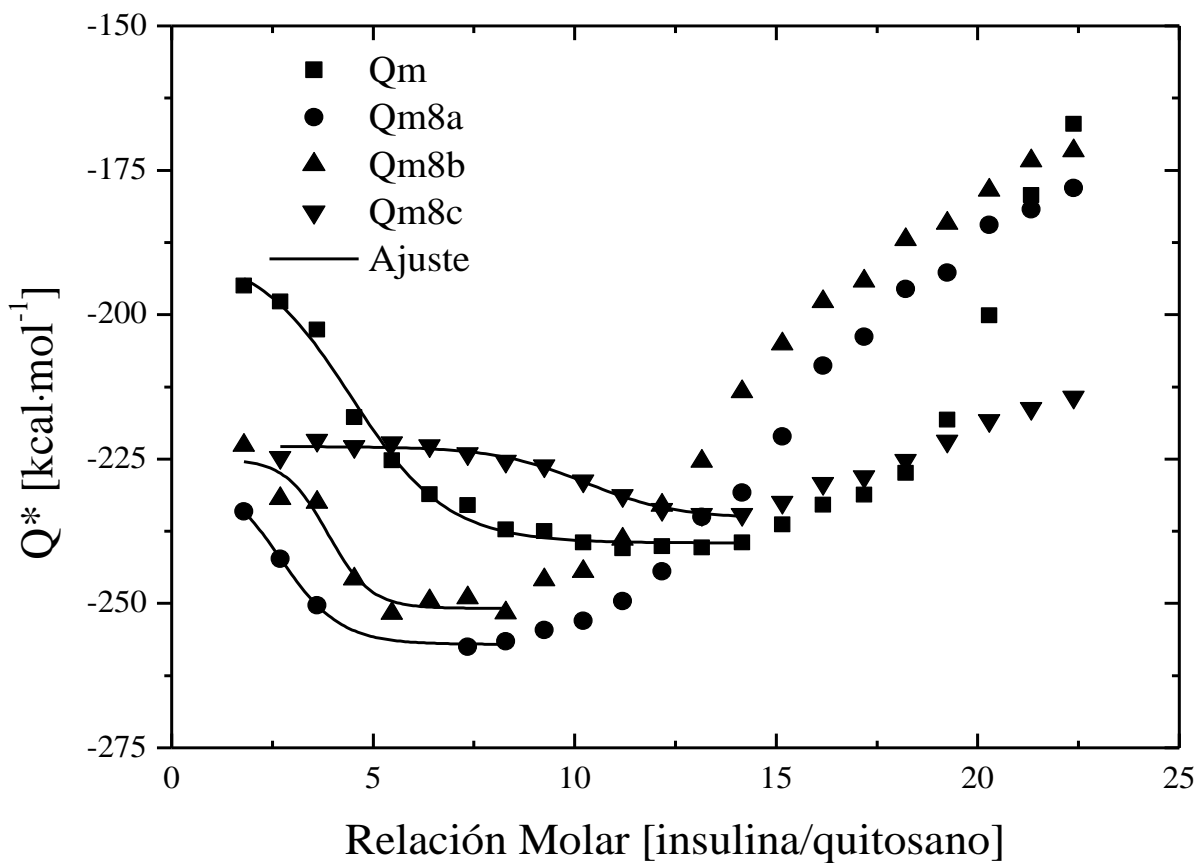


Figura 32.- Calor de formación de NPs de quitosano-insulina, en función de la relación molar insulina/quitosano. Las NPs fueron formadas con el Qm y los diferentes quitosanos derivatizados con octilaldehído en las diferentes proporciones. La línea sólida representa el ajuste matemático de los datos experimentales. Las contribuciones de las diluciones fueron sustraídas. Temperatura de la celda de medición fue de 25 °C.

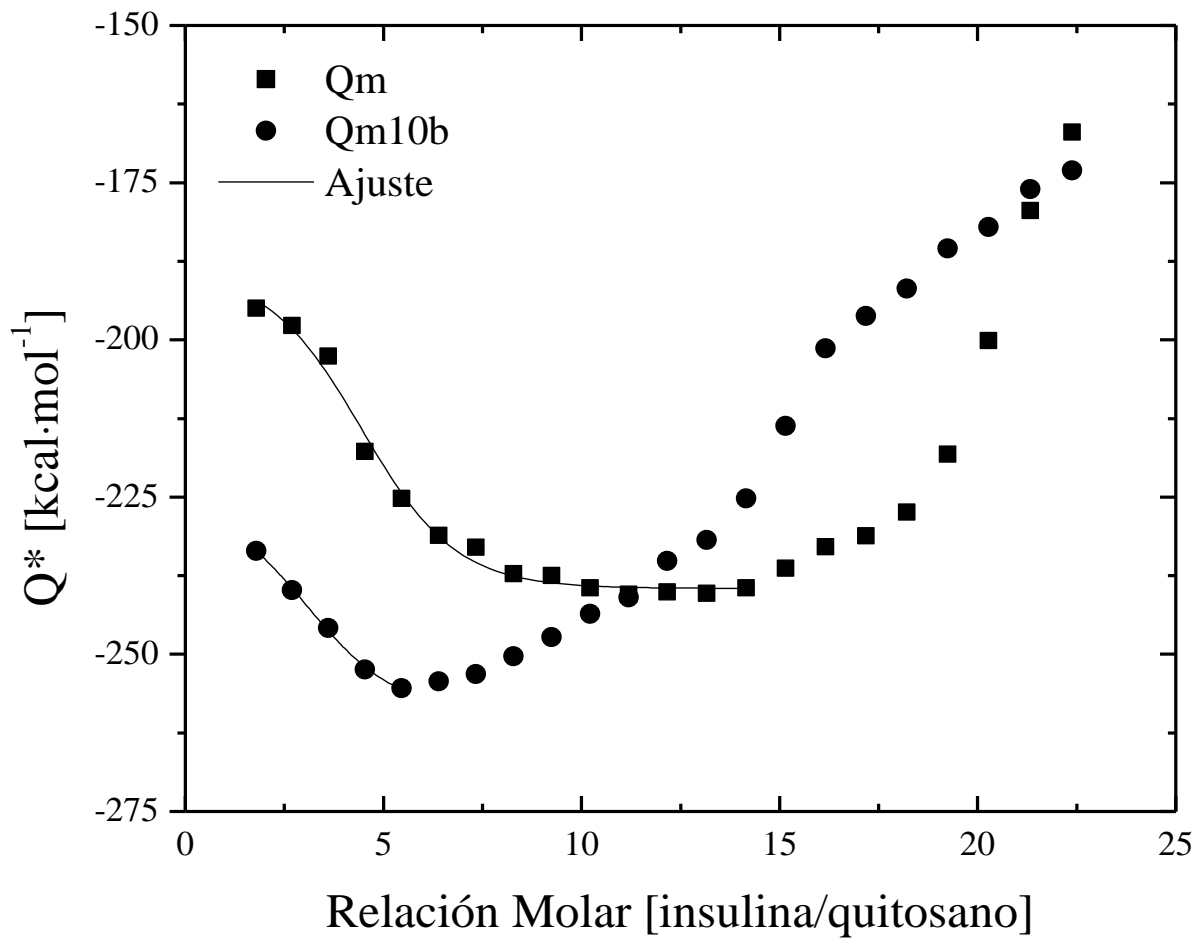


Figura 33.- Calor de formación de NPs de quitosano-insulina, en función de la relación molar insulina/quitosano. Las NPs fueron formadas con el Qm y quitosano derivatizado con decilaldehído con grado de sustitución del 10 %. La línea sólida representa el ajuste matemático de los datos experimentales. Las contribuciones de las diluciones fueron sustraídas. Temperatura de la celda de medición fue de $25\text{ }^\circ\text{C}$.

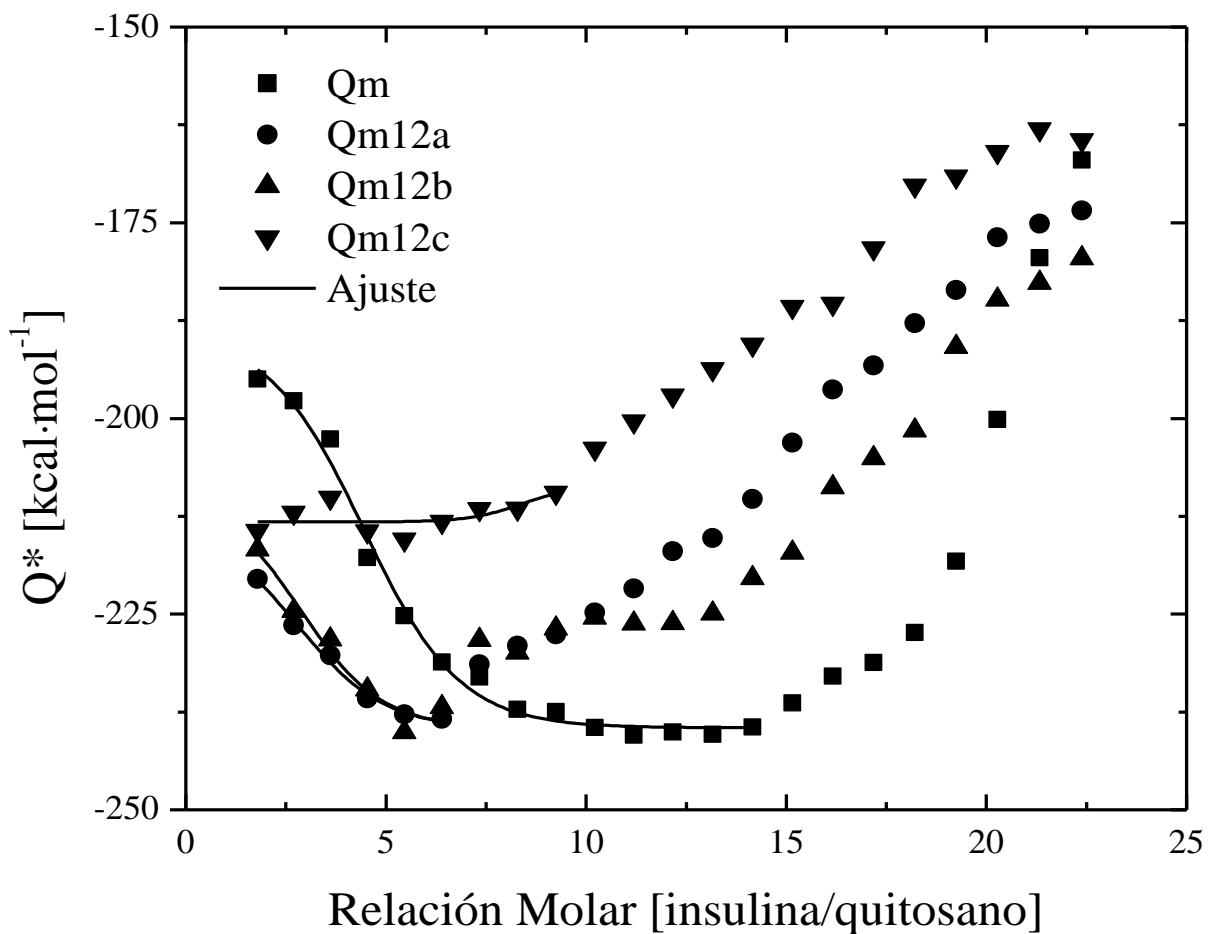


Figura 34.- Calor de formación de NPs de quitosano-insulina, en función de la relación molar insulina/quitosano. Las NPs fueron formadas con el Qm y los diferentes quitosanos derivatizados con dodecinaldehído en las diferentes proporciones. La línea sólida representa el ajuste matemático de los datos experimentales. Las contribuciones de las diluciones fueron sustraídas. Temperatura de la celda de medición fue de 25 °C.

4.4.2 Magnitudes termodinámicas del proceso de formación las NPQIs.

La calorimetría de titulación isotérmica es una técnica sensible donde el efecto de varios calores determina la forma de asociación isotérmica de las moléculas en reacción. Estos efectos podrían ser, la dilución de los ligandos de las macromoléculas, la condensación o agregación de los productos resultantes, los efectos de protonación y posiblemente los cambios estructurales debido a la asociación⁸⁸⁻⁸⁹. Como se mencionó anteriormente, el segundo estado de asociación se espera que represente un fenómeno subyacente y diferente al ocurrido durante la transición conformacional de las NPs por encima de la interacción insulina-quitosano. En consecuencia, con la finalidad de evaluar las interacciones insulina-quitosano las cuales creemos que controlan en última instancia la liberación de la insulina, solo caracterizamos termodinámicamente la primera etapa de asociación mediante un ajuste teórico de los datos experimentales⁸⁹⁻⁹⁰. La Tabla 4 resume los parámetros termodinámicos obtenidos del ajuste matemático. Los valores de la constante de asociación K_b , encontrados para todos los sistemas, son de un orden de magnitud similar (10^4 M^{-1}). Estos valores tienen concordancia con valores previamente reportados en otros sistemas que incluyen polímeros catiónicos^{89 91 92}, proteínas^{93 94} y que en general aumentan a medida que el grado de sustitución aumenta. Los valores negativos de ΔH en las muestras Qm8a y Qm8b junto con la baja estequiometría, comparada con la muestra Qm apoya la noción de que una menor cantidad de proteína interactúa a través del enlace electrostático con el polímero. Esta tendencia permanece en los quitosanos derivatizados con 10 y 12 carbonos en los mismos porcentajes de asociación (5 y 10 %).

Tabla 4.- Parámetros termodinámicos de interacción entre la insulina y el quitosano en la formación de nanopartículas de quitosano-insulina.

N.º	Quitosano	<i>n</i>	$K_b \times 10^4$ [M ⁻¹]	ΔH [kcal/mol]	ΔG [kcal/mol]	ΔS [kcal/mol·K]
1	Qm	4.29 ± 0.5	1.96 ± 0.1	-53.9 ± 3	-5.86	-0.16
2	Qm8a	2.68 ± 0.2	1.89 ± 0.3	-30.1 ± 5	-5.83	-0.08
3	Qm8b	3.88 ± 0.1	2.71 ± 0.9	-25.9 ± 1	-6.05	-0.06
4	Qm8c	10.24 ± 0.4	3.38 ± 0.5	-12.4 ± 1	-4.81	-0.02
5	Qm10b	3.07 ± 0.4	1.3 ± 0.3	-33.60 ± 4	-5.6	-0.09
6	Qm12a	2.8 ± 0.4	1.63 ± 0.2	-26.32 ± 3	-5.75	-0.07
7	Qm12b	2.9 ± 0.4	1.33 ± 0.3	-29.75 ± 4	-5.63	-0.08
8	Qm12c	8.42 ± 0.3	5.72 ± 0.2	-4.73 ± 1	-6.49	0.06

K_b , constante de asociación; *n*, estequiometría; ΔH , cambio de entalpía; ΔG , cambio de la energía libre de Gibbs; ΔS , cambio de la entropía.

Para la muestra Qm8c, la combinación del valor más bajo de la entalpía y una mayor estequiometría corrobora la idea de que la insulina interactúa a través del acoplamiento entre las interacciones electrostáticas y el efecto hidrofóbico con el polímero en la formación de las NPs. En cualquier caso, la formación de las NPs es coordinado por efecto entálpico.

4.5 Eficiencia de asociación y de carga de las NPQIs.

4.5.1 Eficiencia de asociación y capacidad de carga.

Con la finalidad de determinar las mejores condiciones para formar NPs con alta eficiencia de asociación (AE, ecuación [5]) y eficiencia de carga (LE, ecuación [6]) de la proteína sobre la nanopartícula polimérica, se emplearon diferentes condiciones para la acomplejación de la proteína en las NPs de quitosano-TPP. Además, se consideró el efecto del pH de las suspensiones de las NPs donde se analizaron tanto la AE como la EL, mostrando que existe una influencia del pH en el proceso de entrecruzamiento y formación de las NPs de quitosano-TPP y sus propiedades físico-químicas⁹⁵. Es preciso mencionar que en experimentos iniciales, se observaron valores relativamente bajos de AE cuando las soluciones de quitosano tienen una transición de un medio con un pH muy ácido a un estado neutro o alcalino. Y de manera similar cuando las soluciones de insulina-TPP pasaban de un pH altamente alcalino a un estado neutro o ácido. Bajo estas consideraciones, se optó por utilizar la metodología descrita en la sección experimental, la cual arrojó las mayores eficiencias tanto de asociación (AE), como de carga (LE).

En la Tabla 5, están descritos los resultados obtenidos de AE y LE de las suspensiones de NPQIs con un pH de solución final de 5.3 y 6.0 para las NPs formadas con quitosano sin modificar Q_m y los diferentes quitosanos derivatizados. De estos resultados se destaca que tanto los valores de AEs como de LCs son mayores comparativamente a un pH de 5.3 que a pH 6.0 para las NPs formadas con quitosano sin modificar Q_m . Esto podría ser a consecuencia de la proximidad del valor de pK_a ⁷⁶ del quitosano, disminuyendo el número de las

interacciones electrostáticas entre la proteína y el polielectrolito. Por otro lado, se observó una mayor asociación de la insulina en las NPs formadas con el quitosano hidrofobizados suspendidas en un medio a pH 6.0, concordando con comportamientos previamente reportados⁷⁶. Los valores obtenidos de la AE y LC a este pH son más altos que los valores reportados previamente con sistemas semejantes de NPs de quitosano^{45, 77, 96-97}. A pH 6.0, la proteína está cargada negativamente debido a la cercanía al punto isoeléctrico de la insulina (pI~5.4) y puede ser adsorbida efectivamente en los quitosanos derivatizados,⁹⁸. Este efecto se debe a las repulsiones electrostáticas minimizadas entre las cadenas del polímero (las cuales favorecen al atrapamiento y por consiguiente la carga de la proteína) y las cadenas de proteína, permitiendo que el efecto hidrofóbico de las cadenas laterales adicionadas al quitosano interactúen tanto electrostáticamente, como hidrofobicamente con la proteína.

Los valores máximos observados de AE y LE corresponden a las NPs formadas con los quitosanos con grado de sustitución del 10 %, mientras que las suspensiones de NPs formadas con quitosanos con mayor grado de sustitución (50 %) mostraron los valores mínimos de AE a pH de 5.3. Estos resultados mantienen coherencia con un efecto de dominio entre la proteína y las cadenas hidrofóbicas, al tratar de colocarse hacia el interior del núcleo de la NP en el proceso de complejación⁷⁹⁻⁸⁰. En contraste, a pH 6.0 estas suspensiones de NPs muestran valores de AE y LE relativamente mayores, lo cual corrobora la influencia del efecto hidrofóbicas en el proceso de carga de la proteína durante el proceso de formación de la nanopartícula.

Tabla 5.- Resultados de la eficiencia de asociación (AE) y eficiencia de carga (LE) en diferentes pH de los NPQIs obtenidos a temperatura ambiente.

N.º	Quitosano	AE [%] (pH 5.3)	LE [%] (pH 5.3)	AE [%] (pH 6.0)	LE [%] (pH 6.0)
1	Qm	63 ± 5	27 ± 6	46 ± 4	18 ± 4
2	Qm8a	56 ± 5	18 ± 5	83 ± 3	35 ± 5
3	Qm8b	60 ± 4	27 ± 5	94 ± 5	36 ± 3
4	Qm8c	42 ± 5	17 ± 6	96 ± 3	37 ± 5
5	Qm10b	30 ± 5	13 ± 4	77 ± 5	25 ± 2
6	Qm12a	25 ± 4	11 ± 5	70 ± 5	36 ± 4
7	Qm12b	55 ± 6	25 ± 5	84 ± 5	38 ± 3
8	Qm12c	20 ± 5	22 ± 5	75 ± 5	38 ± 3

4.5.2 Proceso de liberación de la insulina de la nanopartícula.

En investigaciones realizadas con sistemas poliméricos se ha observado que el proceso de liberación de la proteína insulina es caracterizado por una rápida liberación inicial, conocida como “*phase burst*”. En esta fase, entre el 30 y 70 % de la proteína, es liberada al medio en las primeras horas, seguida de una fase de liberación lenta y sostenida, este efecto provoca que gran cantidad del fármaco no sea aprovechado por el organismo reduciendo

considerablemente la biodisponibilidad del producto. En el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 es deseable un perfil de liberación sostenido con la finalidad de mantener la concentración de insulina en la sangre constante y evitar una sobre dosis del fármaco en el organismo, la cual pudiera provocar efectos secundarios adversos en el paciente. Por esta razón se ha estudiado la cinética de liberación de las NPs formadas con los quitosanos derivatizados y comparada con la cinética de la insulina liberada de las NPs formadas con Qm. Este estudio se realizó en un periodo corto de incubación, con la finalidad de determinar la influencia de la modificación hidrofóbica del quitosano en la modulación de las fases de liberación dentro del periodo de tiempo donde la proteína es absorbida hacia el torrente sanguíneo. Se espera que las cadenas alifáticas en el quitosano modificado hidrofóticamente, ayuden a suprimir o retardar parcialmente la fase de liberación rápida. Debido a que el proceso de liberación del fármaco es un proceso multifactorial (pH, temperatura, agitación, etc.)³⁵. Los estudios *in vitro* de liberación se realizaron con el fin de evaluar el efecto de la variación en la hidrofobización del quitosano y del ambiente iónico donde la insulina es liberada. La proteína atrapada o encapsulada en una matriz de polímero (*e.g.* nanopartículas) biodegradable como el quitosano, usualmente es liberada en un proceso dominado por tres mecanismos secuenciales: (1) Ocurre la desadsorción de la proteína de la superficie de la NP; (2) difusión y readsorción de la proteína a través de la red polimérica; (3) degradación y erosión de las NPs^{35, 99}. De la Figura 35 a la Figura 37, se muestran la cinética de liberación de la insulina de las NPQIs dispersas en un medio acuoso a pH de 5.3, 6.0 y 7.4, respectivamente y temperatura de 37 °C. De estos resultados, se aprecia que durante la primera hora de incubación a pH 5.3 y 7.4, la insulina es liberada más rápidamente en todas las suspensiones de NPQIs. Particularmente, para las NPs hechas con Qm más del 50 % del total de la insulina es liberado al medio.

Transcurrido este tiempo, domina una liberación lenta en todas las muestras. En esta fase, el proceso de liberación mantiene una tendencia lineal en las suspensiones a pH 5.3 y 7.4. Este comportamiento ha sido previamente observado en quitosanos derivatizados con moléculas de glicol⁴⁵. Sin embargo, después de 6 h de incubación, cerca del 90 % de la insulina es liberada en NPQIs formadas con Qm, mientras que solo el 50 % del total de la insulina se libera las NPQIs formadas con los quitosanos derivatizados, ambas en un medio con pH 5.3, excepto las NPQIs hechas con la muestra Qm8a, la cual libera cerca del 70 % de la insulina. En contraste, en el perfil de liberación realizado a pH 6.0, la insulina escapa más lentamente a consecuencia de la baja solubilidad de las cadenas de quitosano (debido a la proximidad con su pK_a), el cual puede propiciar que la insulina se ancle fuertemente en el interior de la NP y no en la superficie de la NP, lo cual podría ocasionar una liberación acelerada como se ha observado previamente^{26, 35}. En este sentido, a un pH 5.3, la repulsión electrostática polímero-proteína y polímero-polímero puede facilitar la liberación de la insulina, mientras que, a pH 6.0 la liberación se retrasa debido a⁷⁶: (1) cambios en la carga neta de la proteína (*e.g.* negativo), los cuales favorecen la interacción entre el grupo carboxilo de la proteína con los grupos aminos protonados del quitosano; (2) un aumento del efecto hidrofóbico entre las cadenas del quitosano y los puentes de hidrógeno formados entre la proteína y el polímero, especialmente en NPs formadas con los polímeros más hidrofóbicos (Qm8c y Qm12b)⁷⁶, los cuales muestran un perfil de liberación más controlado. La última interacción también juega un rol importante en el mecanismo de liberación en las suspensiones a pH 7.4. Aquí, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la modificación hidrofóbica del quitosano en la formación de las NPQIs puede ser crucial en el control de la liberación de la insulina, tanto en los estudios desarrollados a nivel *in vitro* como posiblemente *in vivo*.

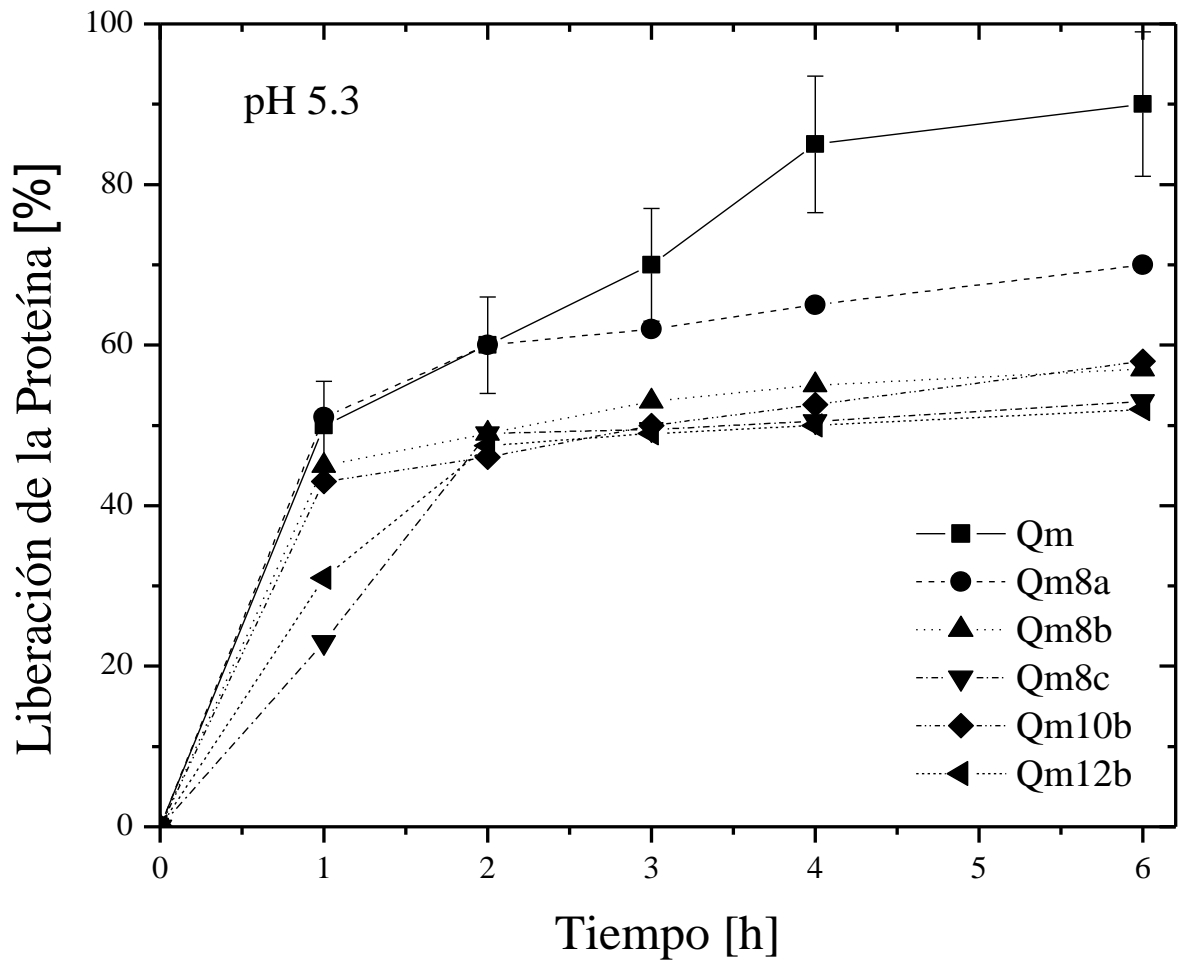


Figura 35.- Cinética de liberación *in vitro* de la insulina de NPs formadas con Qm y quitosano derivatizados dispersas en un buffer de acetato a un pH 5.3 y a una temperatura de 37 °C.

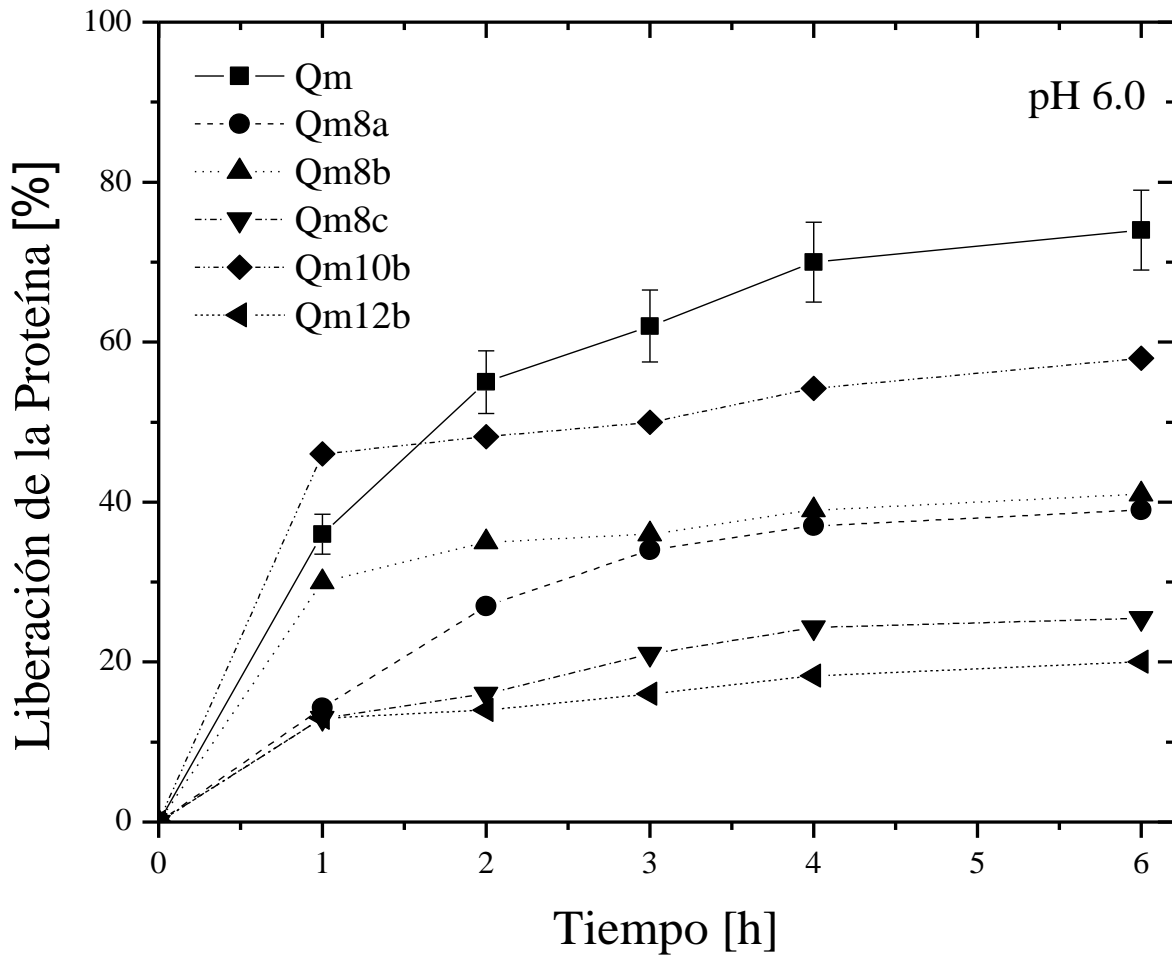


Figura 36.- Cinética de liberación *in vitro* de la insulina de NPs formadas con Qm y quitosano derivatizados dispersas en buffer de fosfato a un pH 6.0 y a una temperatura de 37 °C.

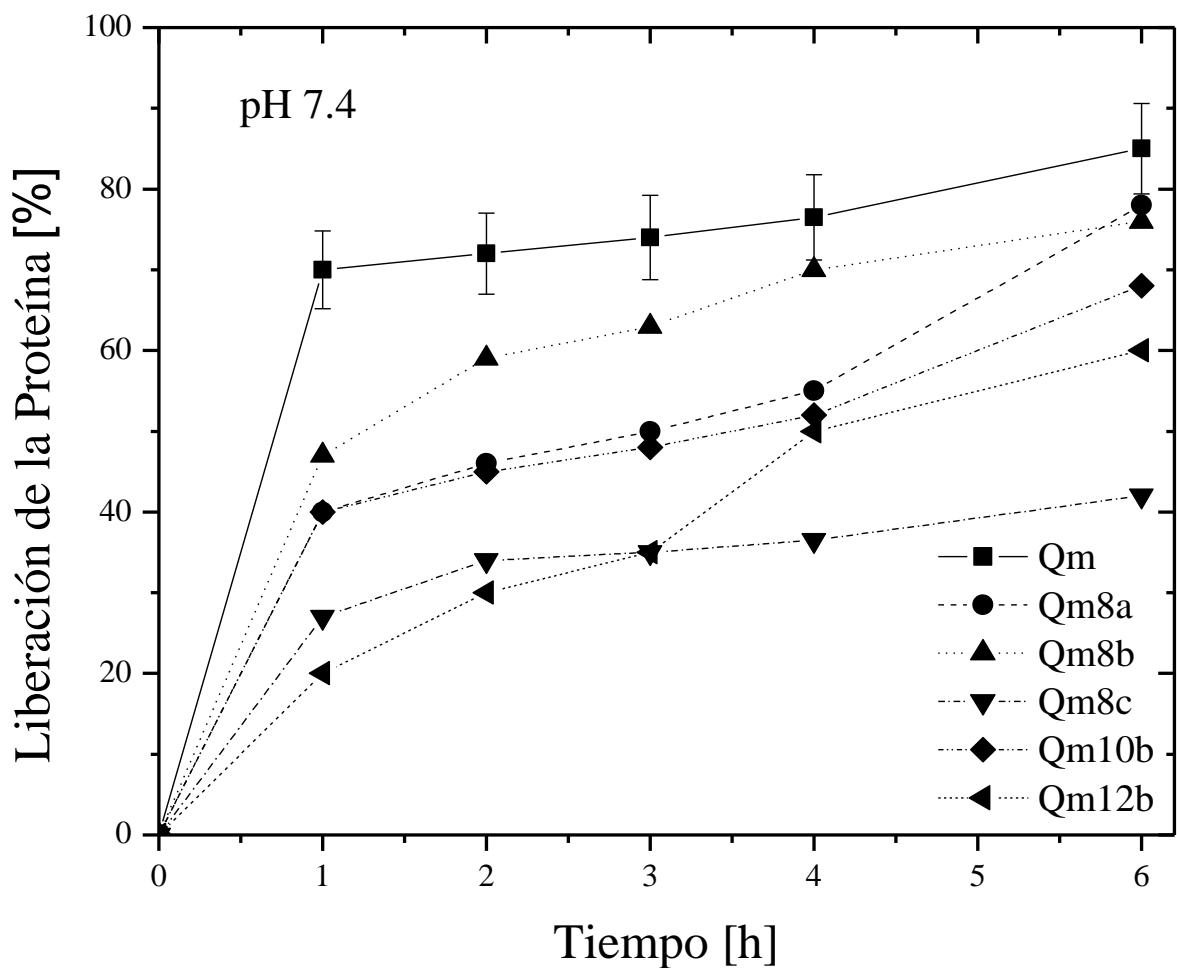


Figura 37.- Cinética de liberación *in vitro* de la insulina de NPs formadas con Qm y quitosano derivatizados dispersas en buffer de fosfatos a un pH 7.4 y a una temperatura de 37 °C.

4.6 Conformación estructural de la insulina.

Se realizó el estudio de dicroísmo circular (CD) a la insulina complejada con los diferentes quitosanos tras la liberación después de 6 horas a pH 7.4. En la Figura 38 se muestran los espectros de la insulina sin acomplejar como señal de referencia, y las demás curvas corresponden a los espectros de la insulina liberada tras la acomplejación con quitosano comercial Qm y los diferentes quitosanos derivatizados. En el espectro de CD en la región lejana de UV se observa dos mínimos en 208 y 223 nm, mientras que, en la región cercana-UV del espectro CD muestra una banda ligeramente negativa cercana a los 275 nm. Para todos los casos se calculó la proporción entre los valores de la elipticidad residual a 208 y 223 nm, donde el resultado es muy similar en la insulina sin acomplejar y la insulina liberada ($\theta_{223}/\theta_{208}=0.8 \pm 0.05$). Usualmente, en el estudio conformacional de la insulina en la técnica de CD se observan unas bandas negativas características en 208, 223 y 273 nm¹⁰⁰. En la región cercana-UV del espectro de CD, se puede observar una banda cercana a 275 nm asociada con la auto asociación estructural de la insulina. En la región lejana-UV del espectro CD, la banda localizada a 208 nm surge principalmente de las hélices- α formados por los aminoácidos B10-B19, A2-A6 y A13-A19 (ver Figura 3), mientras que la banda en 223 nm (también asociada a las hélices- α) es afectada por la estructura- β de la proteína. Se sabe que cuando dos monómeros de insulina forman dímeros, se forma una estructura- β anti paralela, aumentando la señal de la elipticidad en 223 nm sin afectar la señal a 208 nm^{101 102 103}. Como se muestra en la Figura 38, la acomplejación de la insulina con los diferentes quitosanos no afecta la estructuración de la proteína, dejando a la insulina tras la liberación con sus características que la hacen biológicamente funcional.

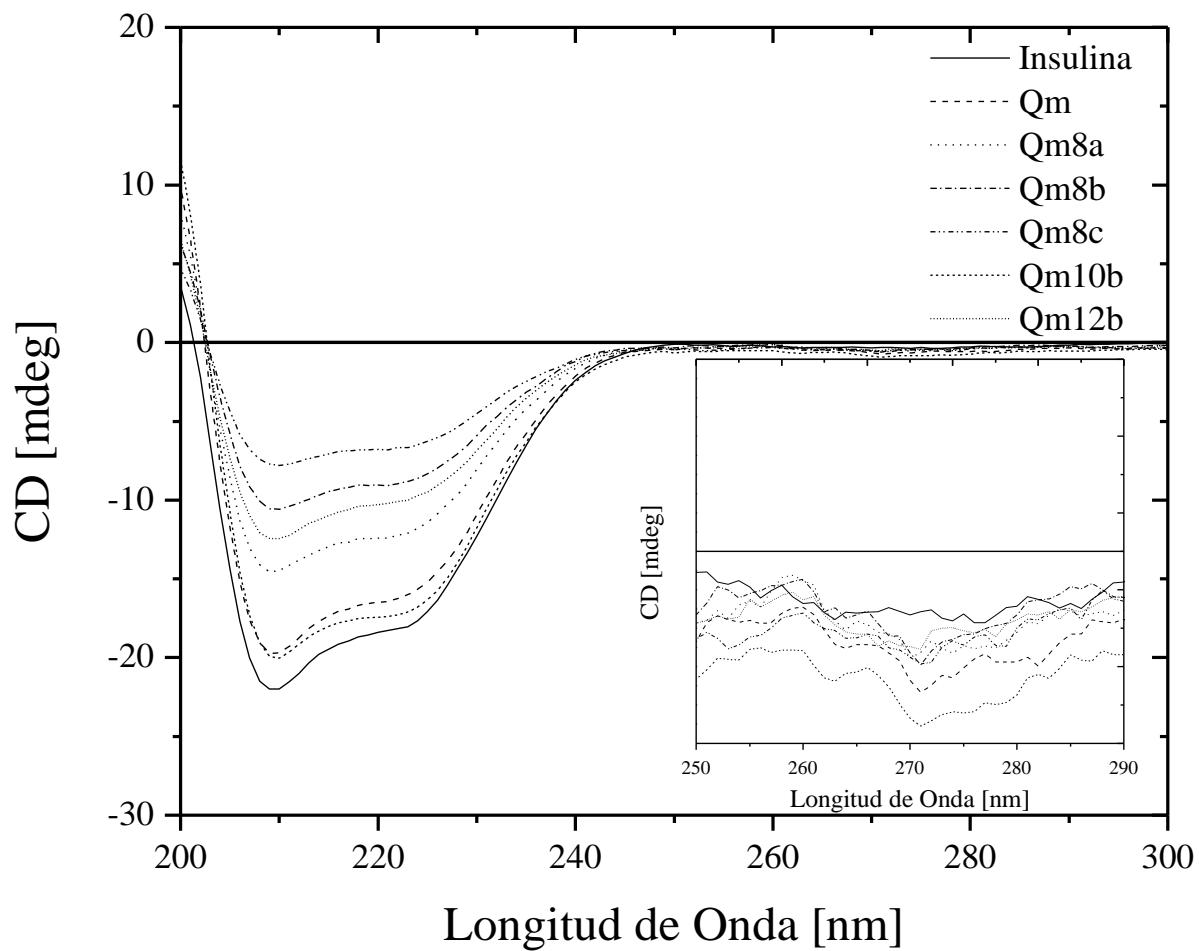


Figura 38.- Espectro de dicroísmo circular en la región lejana y cercana de UV de la insulina sin acomplejar e insulina liberada tras la acomplejación con diferentes quitosanos después de 6 horas en buffer fosfato (pH 7.4).

Capítulo V

5 Conclusiones

En este trabajo se ha investigado la influencia del quitosano hidrofobizado en la complejación con la proteína insulina en la formación de nanopartículas, junto con sus propiedades fisicoquímicas. La derivatización del quitosano se realizó mediante la reacción de alquilación, sustituyendo en los grupos aminos del quitosano, aldehídos de diferente peso molecular (8, 10 y 12 carbonos), controlando el grado de sustitución (5, 10 y 50 %). El efecto de la hidrofobización del quitosano quedó demostrado con los resultados de tensiometría dinámica, al mostrar como el grado de hidrofobización, aumentaba el módulo elástico de la interfase aire-líquido de los quitosanos en suspensión. Además, la hidrofobización en la formación de las nanopartículas afectó disminuyendo el promedio los diámetros de las NPs, tanto en las nanopartículas con (de 360 a 236 nm) y sin insulina (de 500 a 140 nm). Este efecto se corroboró mediante imágenes de AFM y TEM, donde también se observó una alteración en la morfología de las nanopartículas respecto a las NPs formadas con quitosano comercial. Esta alteración en la forma de las NPs se presentó en un cambio de semiesferas a una forma tipo ovoide, asociado a la restructuración de la nanopartícula por influencia de los grupos hidrófobos presentes en el quitosano derivatizado. Mediante potencial zeta observamos un incremento en las cargas superficiales en las NPQIs formadas con quitosano derivatizado respecto a las NPQIs formadas con el quitosano comercial (de 7 a 28 mV en promedio). Este efecto se atribuye a una exposición de los grupos amino por efecto de la interacción asociativa de la insulina con los grupos hidrófobos en los quitosanos derivatizados, los cuales tienen a reducir la exposición con el solvente, obligándose a estructurarse hacia el núcleo de la NP. Por otro lado, los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica realizados para

comprender el proceso de formación de las NPs, mostraron que existe una influencia exotérmica en las interacciones electrostáticas de interacción insulina-quitosano. Esto se demostró al observar que a medida que aumentaba la hidrofobicidad en la acomplejación aumentaba el efecto hidrofóbico (cuyo proceso es endotérmico) sobre la interacción electrostática. Este comportamiento podría explicar la reducción en el perfil de liberación de la insulina en las NPs formadas con quitosanos hidrofóbicamente modificados. También se experimentó con las condiciones de formación de nanopartículas complejadas con insulina (NPQIs) variando el pH. De manera particular, las soluciones de quitosano y de insulina-TPP con un cambio leve en el pH, produjeron NPs con una mejor eficiencia de asociación y de carga de la proteína en la nanopartícula. En donde a un pH de 6.0 se observaron los mejores valores de AE y LE para las NPQIs hechas con quitosano derivatizado, respecto al quitosano comercial. Por último, se demostró mediante mediciones de dicroísmo circular que la insulina conserva su estructuración secundaria y terciaria, permitiéndole mantener su funcionalidad biológica tras la liberación de la nanopartícula polimérica.

Perspectivas y Recomendaciones

La modificación hidrofóbica del quitosano mostró tener cualidades que mejoran las propiedades naturales del quitosano sin modificar. Adicionado a la formación de las nanopartículas, la acomplejación de la insulina tiene un gran potencial para ser desarrollado farmacéuticamente como sistema de liberación y entrega de fármaco. Con esta idea, la perspectiva de este trabajo de investigación nos lleva a sugerir un estudio de penetrabilidad de la proteína en una membrana celular. Este estudio podría desarrollarse en una balanza de Langmuir, simulando con la ayuda de fosfolípidos una pared celular y depositando las nanopartículas insulina-quitosano en diferentes medios acuosos. Esta idea nos lleva a sugerir un estudio de liberación *in vivo* por vía oral o nasal, para definir cualitativamente la biodisponibilidad del fármaco en función de la adhesividad proporcionada por los grupos hidrófobos anclados al quitosano. Este trabajo podría terminar por definir las cualidades del sistema a nivel comercial.

Respecto a la derivatización del quitosano, existen perspectivas igualmente interesantes. En términos de entender la interacción intramoleculares del quitosano modificado y la insulina o alguna otra molécula, podrían desarrollarse estudios tanto de tensiometría más detallados y estudios de microreología. A fin de elucidar la afectación estructural por efecto de la hidrofobización adicionada al polímero.

Referencias

- [1] Peppas, N. A. *MRS Bulletin* **2006**, *31*, 888-893.
- [2] Jain, D.; Panda, A. K.; Majumdar, D. K. *AAPS PharmSciTech.* **2005**, *Author's final version*.
- [3] Delie, F.; Blanco, M. J. *Molecules* **2005**, *10*, 65-80.
- [4] Pasquali, R. C.; Chiappetta, D. A.; Bregni, C. *Acta Farmaceutica Bonaerense* **2005**, *24*, 610-618.
- [5] Li, Y.; Pei, Y.; Zhang, X.; Gu, Z.; Zhou, Z.; Yuan, W.; Zhou, J.; Zhu, J.; Gao, X. *Journal of Controlled Release* **2001**, *71*, 203-211.
- [6] Sarmiento, B.; Ferreira, D. C.; Jorgensen, L.; Weert, M. V. d. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65*, 10-17.
- [7] Chen, F.; Zhang, Z. R.; Huang, Y. *Int. J. Pharm.* **2007**, *336*, 166-173.
- [8] Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. *J. Control. Release* **2001**, *70*, 1-20.
- [9] Gupta, V. K.; Karar, P. K.; Ramesh, S.; Misra, S. P.; Gupta, A. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences* **2010**, *1*, 163-169.
- [10] Kesisoglou, F.; Panmai, S.; Wu, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 631-644.
- [11] Pison, U.; Welte, T.; Giersig, M.; Groneberg, D. A.; 11. Pison, U. W., T.; Giersig, M.; Groneberg, D. A. Nanomedicine for respiratory diseases. *Eur. J. Pharmacol*, 2006, *533*(1-3), 341-350 *Eur. J. Pharmacol* **2006**, *533*, 341-350.
- [12] Parra, H.; Burboa, M. G.; Sanchez, M.; Juarez, J.; Goycolea, F. M.; Valdez, M. A. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2416-2426.
- [13] Yalpani, M.; Hall, L. D. *Macromolecules* **1984**, *17*, 272-281.
- [14] Varshosaz, J. *Recent patents on endocrine, metabolic and immune drug discovery* **2007**, *1*, 25-40.
- [15] Khalatur, P. G.; Khokhlov, A. R.; Kovalenko, J. N.; Mologin, D. A. *Journal of Chemical Physics* **1999**, *110*, 6039.

- [16] Loh, W. *Encyclopedia of surface and colloid science* **2002**, Marcel Dekker, Inc.
- [17] Discher, D. R.; Eisenberg, A. *Science* **2002**, 297, 967-973.
- [18] Dai, S.; Ravi, P.; Tam, K. C. *Soft Matter* **2008**, 4, 435-449.
- [19] Huynh, D. P.; Nguyen, M. K.; Pi, B. S.; Kim, M. S.; Chae, S. Y.; Lee, K. C.; Kim, B. S.; Kim, S. W.; Lee, D. S. *Biomaterials* **2008**, 29, 2527-2534.
- [20] Losche, M. *Current Opinion in Solid State & Materials Science* **1997**, 2, 546-556.
- [21] Gennes, P. G. d. *Advances in colloid and interface science* **1987**, 27, 189-209.
- [22] MacRitchie, F. *Advances in colloid and interface science* **1986**, 25, 341-385.
- [23] Damge, C.; Reis, C. P.; Maincent, P. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2008**, 5, 45-68.
- [24] Damge, C.; Socha, M.; Ulbrich, N.; Maincent, P. *J. Pharm. Sci.* **2010**, 99, 879-899.
- [25] Wu, Z. M.; Zhou, L.; Guo, X. D.; Jiang, W.; Ling, L.; Qian, Y.; Luo, K. Q.; Zhang, L. *J. Int. J. Pharm.* **2012**, 425, 1-8.
- [26] Fernández-Urrusuno, R.; Calvo, P.; Lopez, C. R.; Jato, J. L. V.; Alonso, M. J. *Pharmaceutical Research* **1999**, 16, 1576-1581.
- [27] Grenha, A.; Seijo, B.; Remuñan, C. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2005**, 25, 427-437.
- [28] Huang, X.; Du, Y. Z.; Yuan, H.; Hu, F. Q. *Carbohydrate Polym.* **2009**, 76, 368-373.
- [29] Berscht, P. C.; Nies, B.; Liebendörfer, A.; Kreuter, J. *Biomaterials* **1994**, 15, 593-600.
- [30] Roberts, G. A., *Chitin Chemistry*. Mac Milan Press Ltd.: London, 1992.
- [31] Kubota, B.; Kikuchi, Y., *Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility*. Marcel Dekker: New York, 1998.
- [32] Dodane, V.; Vilivalam, V. *Pharm Sci Technol Today* **1998**, 1, 246-253.
- [33] Felt, O.; Buri, P.; Gurny, R. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **1998**, 24, 979-993.
- [34] Yao, K. D.; Peng, T.; Yin, Y. J.; Xu, M. X. *JMS-Rev. Macromol. Chem. Phys.* **1995**, 35, 155-180.

- [35] Janes, K. A.; Calvo, P.; Alonso, M. J. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, *47*, 83-97.
- [36] Mao, H.-Q.; Roy, K.; Troung-Le, V. L.; Janes, K. A.; Lin, K. Y.; Wang, Y.; August, J. T.; Leong, K. W. *Journal of Controlled Release* **2001**, *70*, 399-421.
- [37] Wong, T. W. *Recent Patents Drug Deliv. Formul.* **2009**, *3*, 8-25.
- [38] Duceppe, N.; Tabrizian, M. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2625-2631.
- [39] Kim, K.; Kwon, S.; Park, J. H.; Chung, H.; Jeong, S. Y.; Kwon, I. C.; Kim, I. S. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 1154-1158.
- [40] Lee, K. Y.; Kim, J. H.; Kwon, I. C.; Jeong, S. Y. *Colloid Polym. Sci.* **2000**, *278*, 1216-1219.
- [41] Liu, C. G.; Desai, K. G. H.; Chen, X. G.; Park, H. J. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 437-441.
- [42] Chen, X. G.; Lee, C. M.; Park, H. J. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3135-3139.
- [43] Zhang, J.; Chen, X. G.; Li, Y.; Liu, C. S. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2007**, *3*, 258-265.
- [44] Sonia, T. A.; Rekha, M. R.; Sharma, C. P. *Journal of applied polymer science* **2011**, *119*, 2902-2910.
- [45] Jo, H. G.; Min, K. H.; Nam, T. H.; Na, S. J.; Park, J. H.; Jeong, S. Y. *ARCHIVES OF PHARMACAL RESEARCH* **2008**, *31*, 918-923.
- [46] Goycoolea, F.; Argüelles, W.; Higuera, I.; Nakamatsu, J., 1era edición ed.: *Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Fondo editorial de la pontificia Universidad Católica del Perú: 2004; Vol. 1, p 312.
- [47] Illum, L. *Pharmaceutical Research* **1998**, *15*, 1326-1331.
- [48] Fillion, D.; Lavertu, M.; Bushmann, M. D. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3224-3234.
- [49] Rees, P. The role of insulin in blood glucose abnormalities in canine cacesiosis. University of Pretoria, 2010.
- [50] Valsecia, M., Insulinas. In *Farmacología de la diabetes*, Vol. 2, pp 174-191.
- [51] Robles-Avila, E.; Covarrubias, M. A. V.; Carrillo, J. I. A.; Regalado, E. J. J.; Corrales, R. G. *Revista mexicana de física* **2010**, *56*, 106-112.

- [52] Desbrières, J.; Martinez, C.; Rinaudo, M. *International Journal of Biological Macromolecules* **1996**, *19*, 21-28.
- [53] Calvo, P.; Lopez, C. R.; Jato, J. L. V.; Alonso, M. J. *Pharmaceutical Research* **1997**, *14*, 1431-1436.
- [54] Provencher, S. W.; Stepanek, P. *Part. Syst. Charact.* **1996**, *13*, 291.
- [55] Horcas, I.; Fernandez, R.; Gomez-Rodriguez, J. M.; Colchero, J.; Gomez-Herrero, J.; Baro, A. M. *REVIEW OF SCIENTIFIC INSTRUMENTS* **2007**, *78*, 013705.
- [56] Alatorre, M.; Taboada, P.; Hartl, F.; Wagner, T.; Freis, M.; Rodríguez, J. R. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces* **2011**, *82*, 54-62.
- [57] Alatorre, M.; pablo, t.; Krajewska, B.; Willemeit, M.; Deml, A.; Klösel, R.; Rodríguez, J. R. *Journal Physical Chemistry B* **2010**, *114*, 9356-9366.
- [58] England, R.; Homer, J.; Knight, L.; Ell, S. *Clin. Otolaryngol Allied. Sci.* **1999**, *24*, 67-68.
- [59] Mukhopadhyay, P.; Sarkar, K.; Chakraborty, M.; Bhattacharya, S.; Mishra, R.; Kundu, P. P. *Materials Science and Engineering C* **2012**.
- [60] Park, J. W.; Kyung-Hee, C.; Park, K. K. *Bulletin of Korean Chemical Society* **1983**, *4*.
- [61] Tien, C. L.; Lacroix, M.; Ispas-Szabo, P.; Mateescu, M. A. *Journal of Controlled Release* **2003**, *93*, 1-13.
- [62] Xu, J.; Kaplan, D. L.; McCarthy, S. P.; Gross, R. A. *Macromolecules* **1996**, *29*, 3436-3440.
- [63] Signini, R.; Campana-Filho, S. P. *Polymer Bulletin* **1999**, *42*, 159-166.
- [64] Sashiwa, H.; Kawasaki, N.; Nakayama, A.; Muraki, E.; Yamamoto, N.; Aiba, S. I. *Biomacromolecules* **2002**, *3*, 1126-1128.
- [65] Korir, A. K., *Development and Application of Microanalysis NMR Methods*. 2007; p 247.
- [66] YU, J. H.; Du, Y. M.; Zheng, H. *Journal of Wuhan University (Nal. Sci. Ed.)* **1999**, *45*, 440-444.
- [67] Peniche, C.; Arguelles, W.; Davidenko, N.; Sastre, R.; Gallardo, A.; Roman, J. S. *Biomaterials* **1999**, *20*, 1869-1878.

- [68] Zhang, C.; Ping, Q.; Zhang, H.; Shen, J. *European Polymer Journal* **2003**, *39*, 1629-1634.
- [69] Coates, J., *Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach*. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 2000.
- [70] Bhumkar, D. R.; Pokharkar, V. B. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2006**, *7*, 1-6.
- [71] Xu, Y.; Du, Y. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, *250*, 215-226.
- [72] Dwivedi, N.; Arunagirinathan, M. A.; Sharma, S.; Bellare, J. *Journal of Nanomaterials* **2010**, *2010*, 8.
- [73] Panyam, J.; Labhasetwar, V. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55*, 329-347.
- [74] Desai, M. P.; Labhasetwar, V.; Amidon, G. L.; Levy, R. J. *Pharm. Res.* **1996**, *13*, 1838-1845.
- [75] Puertas, A. M.; Nieves, F. J. d. I. *Journal of colloid and interface science* **1999**, *216*, 2221-2229.
- [76] Zengshuan, M.; Hock-Hin, Y.; Lee-Yong, L. *Journal of pharmaceutical sciences* **2002**, *91*, 1396-1404.
- [77] Gan, Q.; Wang, T. *Colloids Surfaces B* **2007**, *59*, 24-34.
- [78] López, T.; Carvalho, E. L. S.; Seijo, B.; Ortega, J. L.; Bastos, D. *Journal of colloid and interface science* **2005**, *283*, 344-351.
- [79] Elsayed, A.; Al-Remawi, M.; Farouk, A.; Badwan, A. *Sudan JMS* **2010**, *5*, 99-110.
- [80] Sadeghi, A. M.; Dorkoosh, F. A.; Avadi, M. R.; Saadat, P.; Rafiee-Tehrani, M.; Junginger, H. E. *International Journal of Pharmaceutics* **2008**, *355*, 299-306.
- [81] Barbosa, S.; Taboada, P.; Mosquera, V. *Chemical Physics* **2005**, *310*, 51-58.
- [82] Matulis, D.; Rouzina, I.; Bloomfield, V. A. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *296*, 1053-1063.
- [83] Kim, W.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *Journal Physical Chemistry B* **2006**, *110*, 10919-25.
- [84] Turgeon, S.; Schmitt, C.; Sanchez, C. *Current Opinion in Colloid Interface Science* **2007**, *12*, 166-178.

- [85] Manning, G. S. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1978**, *11*, 179-246.
- [86] Manning, G. S.; Ray, J. *Journal of biomolecular structure dynamics* **1998**, *16*, 461-476.
- [87] Ball, V.; Winterhalter, M.; Schwinte, P.; Lavalle, P.; Voegel, J. C.; Schaaf, P. *The Journal of physical chemistry B* **2002**, *106*, 2357-2364.
- [88] Wiseman, T.; Williston, S.; Brandts, J. F.; Lin, L. N. *Analytical Biochemistry* **1989**, *179*, 131-137.
- [89] Prevette, L. E.; Kodger, T. E.; Reineke, T. M.; Lynch, M. L. *Langmuir* **2007**, *23*, 9773-84.
- [90] Patel, M. M.; Anchordoquy, T. J. *Biophysical Journal* **2005**, *88*, 2089-2103.
- [91] Nisha, C. K.; Manorama, S. V.; Ganguli, M.; Maiti, S.; Kizhakkedathu, J. N. *Society* **2003**, *20*, 5434-5441.
- [92] Zhou, Y. I.; Li, Y. Z. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **2004**, *60*, 377-384.
- [93] Engler, L. E.; Welch, K. K.; Jacobson, L. J. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *269*, 82-101.
- [94] Milev, S.; Bosshard, H. R.; Jelesarov, I. *Biochemistry* **2005**, *44*, 285-93.
- [95] Ho, J. A.; Park, H. J.; Hwang, S. J. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *249*, 165-174.
- [96] Yan, P.; Jun, Z.; Hui, Z.; Ying, L.; Hui, X.; Gang, W. *Acta Pharmacol sin* **2002**, *11*, 1051-1056.
- [97] Al, S.; Carrión, D.; Seijo, B.; Remuñán, C. *J. Controlled Release* **2012**, *157*, 383-390.
- [98] Muzzarelli, R. A.; Barontini, G.; Rocchetti, R. *Biotechnol Bioeng* **1976**, *18*, 1445-54.
- [99] Janes, K. A.; Alonso, M. J. *Journal of applied polymer science* **2003**, *88*, 2769-2776.
- [100] Oliva, A.; Fariña, J. B.; Labrés, M. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 915-927.
- [101] Pocker, Y.; Biswas, S. B. *Biochemistry* **1980**, *19*, 5043-5049.
- [102] Ettinger, M.; Timasheff, S. N. *Biochemistry* **1971**, *10*, 824-831.

[103] Melberg, S. G.; Johnson, W. C. *Proteins* **1990**, 8, 280-286.

Anexos

Anexo 1

Método Alternativo de formación de las NPs

Este método se basó en la metodología descrita por Alonso *et al.* ²⁶ quienes emplearon la técnica de gelificación ionotrópica con las siguientes condiciones: 4 mg de quitosano se disuelven en 4 mL de ácido acético (0.2 M). El pH de esta solución se amortiguó a 5.3 utilizando una solución de NaOH (0.01 N). Aparte, 2 mg de TPP se disuelven en 2 mL de agua. Las NPQs se forman espontáneamente a medida que se incorpora la solución de TPP en la solución de quitosano, gota a gota y bajo agitación magnética (380 rpm) a temperatura ambiente, durante 20 minutos. Para la complejación de la insulina y formación de las NPQIs, 2 mg de insulina se disolvían en 1 mL de NaOH (0.01 N) y se agregaba a 1 mL de la solución de TPP. Esta mezcla insulina/TPP era después incorporada a la solución de quitosano bajo las mismas condiciones antes descritas.

Ha este método se le agrego la variable de la sonicación con la intención de obtener un grupo de NPs de menor diámetro. Una vez obtenidas las nanopartículas, la suspensión se ponía en sonicación durante 45 minutos en un baño con hielo. El sonicador utilizado es de la marca Bandelin Electronic modelo Sonopuls HD 2200 (200 W, 20kHz y 10 % de poder). Tanto las NPs sonicadas como no-sonicadas fueron concentradas por centrifugación a 5800xg durante 15 minutos y después re-suspendidas para caracterizarse por DLS. Los diámetros promedios de las NPs obtenidas por este método están resumidas en la Tabla 6.

Tabla 6.- Diámetros promedios de NPQs y NPQIs formadas siguiendo el método alternativo. En donde el control del pH de las soluciones de quitosano fue controlado. En la tabla se muestra el efecto de la agitación por sonicación, empleado con la intención de disminuir los diámetros promedios.

N.º	Quitosan Derivatizados	NPQs Diámetro [nm]	NPQs Diámetro [nm] (Sonicadas)	NPQIs Diámetro [nm]	NPQIs Diámetro [nm] (Sonicadas)
1	Qm	310 ± 20	140 ± 20	382 ± 70	380 ± 40
2	Qm8a	338 ± 30	380 ± 30	382 ± 30	480 ± 40
3	Qm8b	620 ± 70	380 ± 40	700 ± 70	380 ± 40
4	Qm8c	380 ± 70	276 ± 30	1000 ± 70	490 ± 50
5	Qm10b	730 ± 70	320 ± 30	900 ± 70	840 ± 70
6	Qm12a	300 ± 35	420 ± 40	540 ± 40	588 ± 60
7	Qm12b	500 ± 60	380 ± 30	1000 ± 70	380 ± 30
8	Qm12c	380 ± 40	578 ± 50	540 ± 40	578 ± 50

Anexo 2

Trabajos Presentados

- Ponencia tipo cartel en el segundo Congreso de Fisiología, Estructura y Diseño de Proteínas con el trabajo “Estudio de la proteína insulina acomplejada con quitosano modificado hidrofóticamente para utilizarse como sistema de liberación y liberación del fármaco”. Celebrado del 28 de Septiembre al 01 de Octubre de 2009 en el Distrito Federal, México.
- Ponencia tipo cartel en la Reunión Universitaria de Investigación en Materiales (RUIM) con el trabajo “Estudio de la proteína insulina acomplejada con quitosano modificado hidrofóticamente para utilizarse como sistema de liberación y liberación del fármaco”. Celebrado del 2 al 4 de Diciembre de 2009 en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.
- Ponencia tipo oral en el Encuentro Internacional e Interdisciplinario en Nanociencia y Nanotecnología (Nanomex'10) con el trabajo “Estudio de asociación de la insulina con nanopartículas de quitosano modificado hidrofóticamente”. Celebrado del 18 al 19 de Noviembre de 2010 en la ciudad de Cuernavaca, Morelos, México.
- Ponencia tipo cartel en la Reunión Universitaria de Investigación en Materiales (RUIM) con el trabajo “Estudio de asociación de la insulina con nanopartículas de quitosano modificado hidrofóticamente”. Celebrado del 8 al 10 de Diciembre de 2010 en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.

- Ponencia tipo cartel en el noveno Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales con el trabajo “Estudio de asociación de la insulina con nanopartículas de quitosano modificado hidrofóticamente”. Celebrado del 1 al 4 de marzo de 2011 en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.
- Ponencia tipo cartel en el TechConnect World Conference and Expo (Nanotech´12) con el trabajo “Properties of hydrophobized chitosan-insulin nanoparticles with different hydrophobic chain sizes”. Celebrado del 18 al 21 de Junio de 2012 en la ciudad de Santa Clara, California, EE.UU.
- Ponencia tipo cartel en la Reunión Universitaria de Investigación en Materiales (RUIM) con el trabajo “Efecto de la hidrofobización en nanopartículas de insulina-quitosano modificado por reacción de alquilación”. Celebrado del 28 al 30 de Noviembre de 2012 en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.
- Ponencia tipo cartel en la Reunión Universitaria de Investigación en Materiales (RUIM) con el trabajo “Complejos insulina-quitosano hidrofóticamente modificado”. Celebrado del 28 al 30 de Noviembre de 2012 en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.

Anexo 3

Publicación

----- Mensaje original -----
--
Asunto: Journal of Applied Polymer Science - Decision on Manuscript #
APP-2012-08-2624.R1
De: sergionaz@gmail.com
Fecha: Sab, 24 de Noviembre de 2012, 9:38 pm
Para: mvaldez@correo.fisica.uson.mx

--

24-Nov-2012

Dear Dr. Valdez:

I am delighted to inform you that your manuscript # APP-2012-08-2624.R1 entitled "Effects of the hydrophobization on chitosan-insulin nanoparticles obtained by an alkylation reaction on chitosan" has been found to be worthy of publication in the Journal of Applied Polymer Science. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter..

Thank you for your contribution to the Journal of Applied Polymer Science:
we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. Sergei Nazarenko
Executive Editor, Journal of Applied Polymer Science
sergionaz@gmail.com

Reviewer(s)' Comments to Author:

Reviewer: 3
Comments to the Author
all comments answered, accept

Reviewer: 1
Comments to the Author
The authors have addressed previous comments/concerns properly.